

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

**Effekte der Lipoxygenase-12/15- und der Lipoxygenase-5-
Hemmung auf die Entwicklung des sekundären
Hirnschadens nach experimentellem Schädel-Hirn-
Trauma**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Christian Brem
aus Türkheim

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

Mitberichterstatter: PD Dr. med. Ines Kaufmann
Prof. Dr. med. Christian Opherke

Mitbetreuung durch die
Promovierte Mitarbeiterin: Dr. med. Nicole Terpolilli

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2018

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis	5
1 Hintergrund	9
1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma	9
1.1.1 Begriffserklärung	9
1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie	9
1.1.3 Klassifikation und Prognose	13
1.1.4 Pathophysiologie	16
<i>Primärer Hirnschaden</i>	16
<i>Sekundärer Hirnschaden</i>	18
Vaskuläre Effekte	18
Inflammatorische Effekte	21
Zelluläre Effekte	22
Oxidativer Stress	26
Nekrose und Apoptose	27
1.2. Lipoxygenasen	30
1.2.1 Lipidperoxidation	30
1.2.2 Aufbau und Funktion	31
1.2.3 Katalysierte Reaktionen	32
1.2.4 12/15-Lipoxygenasen	33
<i>Substrate und Reaktionsprodukte</i>	33
<i>Biologische Rolle der 12/15-Lipoxygenasen</i>	35

1.2.5	5-Lipoxygenase	36
	<i>Substrate und Reaktionsprodukte</i>	36
	<i>Biologische Rolle der 5-Lipoxygenasen</i>	38
1.2.6	Lipoxygenasen im zentralen Nervensystem	39
1.3	Rolle von LOX-Inhibitoren in-vitro	41
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit	43
2	Material und Methoden	44
2.1	Versuchstiere	44
2.2	Narkose	44
2.3	Chirurgische Präparation und Traumainduktion	45
2.4	Medikamente und Chemikalien	46
2.4.1	Pharmakologische Hemmung der 12/15-LOX	46
2.4.2	Pharmakologische Hemmung der 12/15-LOX	47
2.5	Bestimmung des Nekrosevolumens	47
2.5.1	Herstellung der Präparate	47
2.5.2	Histomorphometrische Bestimmung des Läsionsvolumens	48
2.6	Bestimmung des Hirnwassergehaltes	49
2.7	Bestimmung des Neuroscores	49
2.8	Experimentelle Gruppen	51
2.9	Statistische Auswertung	51

3	Ergebnisse	53
3.1	Ergebnisse der Standardisierungsreihe	53
3.2	Einfluss der LOX-12/15-Inhibition auf das Nekrosevolumen nach experimentellem SHT	54
3.3	Einfluss der LOX-5 Inhibition auf das Nekrosevolumen nach experimentellem SHT	56
3.4	Einfluss der LOX-12/15-Inhibition auf das posttraumatische Hirnödeme nach experimentellem SHT	58
3.5	Einfluss der LOX-12/15 Inhibition auf das neurologische Outcome nach experimentellem SHT	60
4	Diskussion	62
4.1	Diskussion der Methoden	62
4.1.1	Controlled-Cortical-Impact-Mausmodell	62
4.1.2	Verwendete Medikamente	66
4.2	Diskussion der Ergebnisse	68
4.2.1	LOX-12/15-Inhibition verringert den posttraumatischen Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma	68
	<i>Posttraumatische Ödementwicklung</i>	68
	<i>Inflammatorische Prozesse</i>	70
	<i>Zelluläre Prozesse</i>	71
	<i>Neurologisches Outcome</i>	73
	<i>Verringerter positiver Effekt bei höheren Inhibitor-Konzentrationen</i>	73
	<i>Zusammenfassung</i>	74

4.2.2	LOX-5-Inhibition durch YS121 hat keinen Einfluss auf das Nekrosevolumen nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma	75
4.3	Schlussfolgerung und Ausblick	77
5	Zusammenfassung	78
6	Quellenverzeichnis	80
7	Danksagung	100
8	Lebenslauf	101
9	Eidesstattliche Versicherung	102

1. Hintergrund

1.1 Das Schädelhirntrauma

1.1.1 Begriffsklärung

Nach Definition der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie ist ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) die „Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/oder Verletzung des Gehirns geführt hat“¹. Als Ursache kommen mehrere Mechanismen in Betracht, zum Beispiel ein direkt eindringender Gegenstand, ein direkter Stoß oder Schlag gegen den Kopf sowie eine Beschleunigung des Kopfes². Das Vorhandensein einer Verletzung der hirnumgebenden Strukturen ist für die Definition nicht unbedingt notwendig, jedoch durchaus möglich. Im Gegensatz zum Schädel-Hirn-Trauma wird eine Verletzung des Kopfes ohne Beteiligung des Gehirns als Schädelprellung bezeichnet^{1,3,4}.

1.1.2 Epidemiologie und Ätiologie

Laut des Gesundheitsberichts des Bundes 2010 gehören intrakranielle Verletzungen sowohl bei Frauen als auch bei den Männern zu den zehn häufigsten Ursachen für einen stationären Krankenhausaufenthalt. Im Jahr 2015 verzeichnete das Statistische Bundesamt in Deutschland insgesamt 256.875 stationäre Aufnahmen aufgrund von Schädel-Hirn-Traumata. Die durchschnittliche Verweildauer betrug 4,2 Tage. Dazu passend geht die Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie in ihren Leitlinien von 2015 von einer Inzidenz von 332/100.000 Einwohner/Jahr aus¹. Eine genaue Inzidenz lässt sich nur schwer bestimmen, da insbesondere leichte und mittlere SHT oft keinen Arztbesuch nach sich ziehen und falls doch, es oft zu einer schnellen Entlassung des Patienten ohne genauere Dokumentation kommt⁵. Auch weltweit ist eine genaue Angabe der Inzidenz schwierig, da unterschiedliche Definitionen, Einteilungen und Vorgaben zur Dokumentation der SHT zwischen einzelnen Ländern und Kulturkreisen bestehen⁶. Zum Beispiel zeigte ein Review der International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury, dass in den 101 untersuchten Studien mehr als 50 verschiedene Definitionen für das Krankheitsbild des leichten Schädelhirntraumas verwendet wurden⁷. So

kommt es, dass die Inzidenzangaben in den neueren Studien zum leichten Schädelhirntrauma zwischen 25/100.000 und 250/100.000/Jahr variieren⁸, wobei eine möglicherweise große Dunkelziffer die Inzidenz auf bis zu 600/100.000/Jahr ansteigen lässt⁹.

Jahr	2010		2011		2012		2013		2014		2015	
	#	Fälle	#	Fälle	#	Fälle	#	Fälle	#	Fälle	#	Fälle
Herzinsuffizienz	5	239.694	2	306.736	1	371.335	1	380.291	1	386.548	1	396.380
Psychische Verhaltensstörungen	3	278.65	3	299.428	2	333.357	2	338.471	2	345.034	2	338.204
Vorhofflattern und Vorhofflimmern	24	139.437	12	181.686	4	250.521	3	262.964	3	277.616	3	280.977
Intrakranielle Verletzung	7	228.655	8	203.784	5	241.701	4	247.179	4	254.594	4	256.875
Pneumonie	11	178.048	4	224.130	7	221.751	7	224.918	8	227.196	5	250.981
Hirnfarkt	25	136.328	9	184.165	6	230.847	6	234.632	6	240.038	6	242.847
Angina pectoris	18	155.868	1	315.552	3	255.625	5	245.829	5	248.457	7	240.084
COPD	30	120.767	16	155.518	14	181.816	13	192.816	11	201.812	9	227.578
Cholelithiasis	8	200.934	5	207.176	8	215.939	8	217.996	10	221.715	10	223.858
Essentielle (primäre) Hypertonie	26	134.372	20	153.872	10	205.496	10	215.854	7	229.423	8	228.277

Tabelle 1 Daten der deutschen Krankenhäuser für die 10 häufigsten Diagnosen zur stationären Aufnahme der Jahre 2010-2015. Bei den Krankenhausaufnahmen bilden die intrakraniellen Verletzungen mit ansteigender Fallzahl aktuell die vierthäufigste Diagnosegruppe¹⁰.

Das US-amerikanische Center for Disease Control (CDC) erhebt regelmäßig genauere Zahlen zur Ätiologie des schweren Schädel-Hirn-Traumas¹¹ (Abb. 1).

Demnach zeigt die altersbezogenen Inzidenz einen mehrgipfligen Kurvenverlauf. Die Maxima liegen hierbei bei Kleinkindern mit ca. 270.000 Fällen pro Jahr, den jungen Erwachsenen mit ca. 210.000 Fällen pro Jahr in der Altersgruppe der 25-34-Jährigen und den Menschen über 75 mit ca. 170.000 Fällen pro Jahr. Die Anzahl der zum Tode führenden Schädel-Hirn-Traumata folgt diesem Kurvenverlauf nicht, sondern hat einen ersten Gipfel in der Adoleszenz und steigt später mit zunehmendem Lebensalter nahezu linear an.

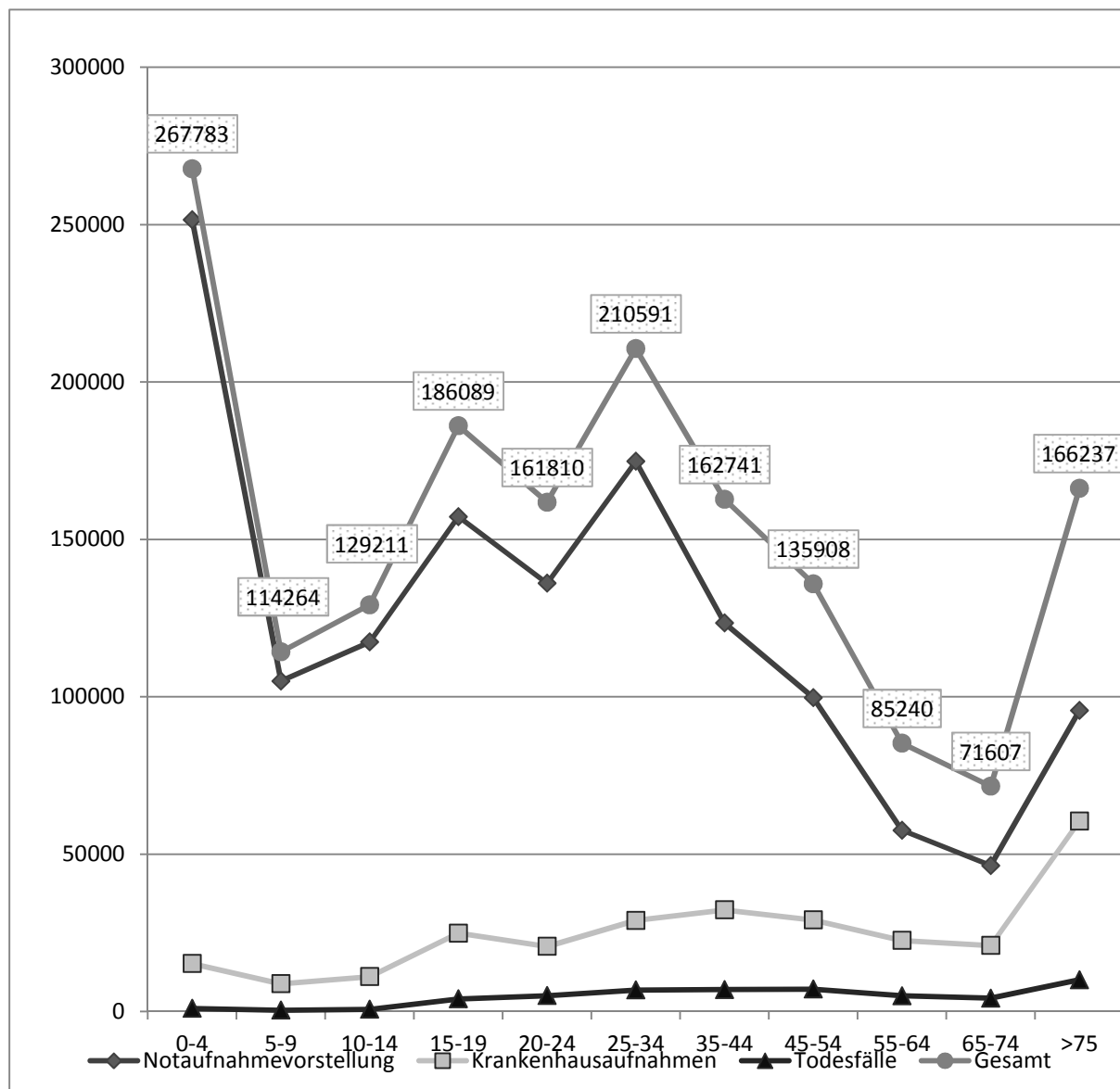


Abbildung 1 Geschätzte jährliche Fallzahl von Schädelhirntraumen in den USA im Zeitraum 2000-2006 nach Alter, getrennte Darstellung von Vorstellungen in der Notaufnahme, Krankenhausaufnahmen und Todesfällen (nach Faul et al¹¹)

Des Weiteren lässt sich erkennen, dass in allen Altersgruppen Männer häufiger betroffen sind als Frauen. Dieser Unterschied lässt sich etwa ab dem 3. Lebensjahr nachweisen¹² und steigt in der Altersgruppe der ca. 10-34-jährigen stark an (Abb. 2). Als Gründe hierfür werden oft geschlechtstypischen Verhaltensweisen angeführt, die mit einer erhöhten Risikobereitschaft der männlichen Jugendlichen einhergeht.

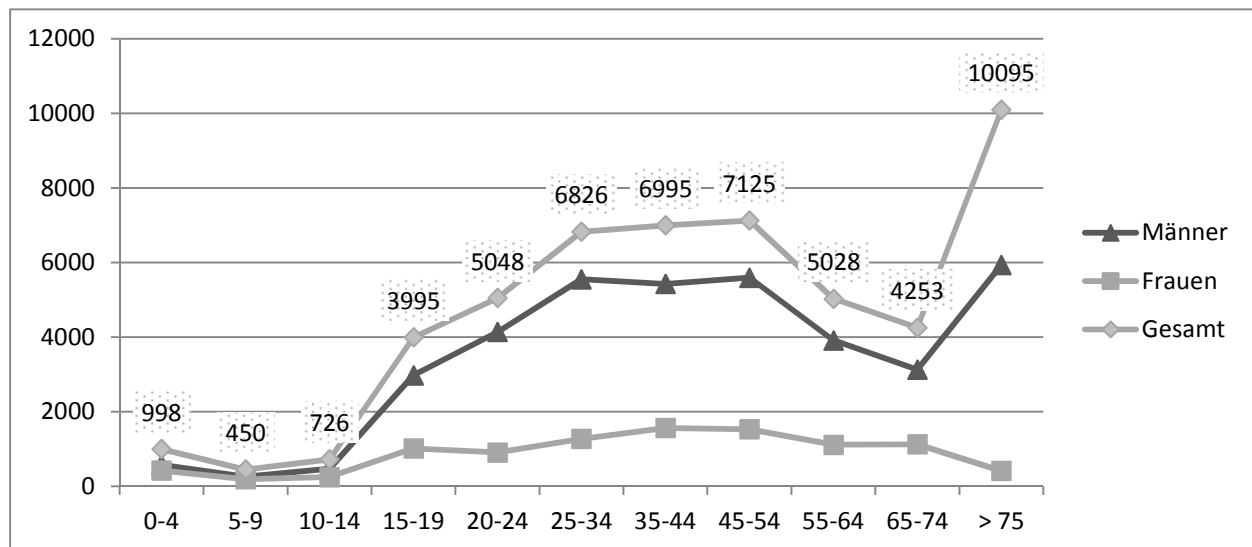


Abbildung 2 Geschätzte durch Schädel-Hirn-Trauma verursachte Todesfälle in den USA pro Jahr (in den Jahren 2002-2006), nach Alter, getrennt nach Geschlecht¹¹

Als Hauptursachen für Schädel-Hirn-Traumata lassen sich Stürze und Verkehrsunfälle identifizieren, wobei die Stürze den deutlich häufigeren Grund darstellen und vor allem in der Altersgruppe der Kleinkinder und der Menschen über 75 Jahren zu finden sind. Als weitere Ursachen für Schädel-Hirn-Traumen lassen sich (gewaltsame) Schläge gegen den Kopf, Sportverletzungen und Schussverletzungen nennen. Die verschiedenen Ätiologien führen dabei jeweils zu unterschiedlichen Verletzungsmustern und damit zu unterschiedlichen Prognosen. Als Sportverletzung treten Schädel-Hirn-Traumen besonders in den Kontaktsportarten auf, wie zum Beispiel dem American Football. Hier kam es in der höchsten amerikanischen Liga, der NFL, in den beiden Spielzeiten 2012/13 und 2013/14 zu insgesamt 292 Schädel-Hirn-Traumen in 408 Spielen, also zu ca. einem Fall in jedem zweiten Spiel¹³. Auch im Fußball (Soccer) gibt es entgegen dem allgemeinen Empfinden eine sehr hohe Rate an Schädel-Hirn-Traumen. Studien haben ergeben, dass bis zu 22% aller Verletzungen beim

Fußball SHT sind¹⁴. Dies führt unter anderem dazu, dass die meisten Sport-assoziierten Schädelhirntraumen bei Frauen in den USA durch Fußball bedingt sind¹⁵. Verkehrsunfälle sind jedoch noch mehr als Sportverletzungen verantwortlich für die Inzidenzspitze der SHT in der Adoleszenz und stellen in allen Altersgruppen den Hauptgrund für Schädel-Hirn-Trauma-assoziierte Todesfälle dar¹¹.

In den letzten Jahren steigt die weltweite Gesamtzahl der Todesfälle durch Schädel-Hirn-Traumata stark an, vor allem in Schwellenländern. Das wird auf die ansteigende Motorisierung in diesen Ländern zurückgeführt⁶. Im Gegensatz dazu sinkt in Industrieländern die Zahl der durch Verkehrsunfälle bedingten tödlichen Schädel-Hirn-Traumen, mutmaßlich aufgrund verschiedener prophylaktischer und politischer Maßnahmen, wie z.B. der Anschnall-⁸ und der Helmpflicht⁵. Insgesamt bleibt in diesen Ländern die Gesamtzahl an Schädel-Hirn-Traumen mit Todesfolge jedoch nahezu konstant. Dies wird auf eine höhere Zahl an Stürzen bei einer immer älter werdenden Bevölkerung zurückgeführt⁶. Insgesamt sind Schädel-Hirn-Traumen in den USA die häufigste Todesursache für Menschen unter 45 Jahren und ursächlich für ca. 40% aller Todesfälle nach Unfällen⁵. Die Gesamtinzidenz für Schädel-Hirn-Traumata mit Todesfolge wird auf ca. 10-35/100.000/Jahr geschätzt, in der EU auf etwa 9-28/100.000/Jahr¹⁶.

1.1.3 Klassifikation und Prognose

Die Abschätzung des Schweregrades eines erlittenen Schädelhirntraumas hat große Bedeutung für die Prognoseabschätzung und die Therapieplanung. Bereits 1928 wurde zur Einteilung des Schweregrades die Dauer einer durch das Trauma verursachten Bewusstseinsstörung postuliert¹⁷.

Als einfache und daher auch relativ gut in Akutsituationen anzuwendende Methode zur Bewertung einer Bewusstseinsstörung hat sich die bereits 1974 publizierte Glasgow Coma Scale (GCS) etabliert^{3,4,18}. Die Bewertung des Patienten erfolgt hierbei nach drei Kategorien: die beste motorische Antwort, die beste sprachliche Antwort und das Augenöffnen. Insgesamt ist eine maximale Punktzahl von 15 zu erreichen. Erreicht der Patient eine Punktzahl von über

<u>Motorische Reaktion</u>	
6	Befolgt Aufforderungen
5	Gezielte Schmerzabwehr
4	Ungezielte Schmerzabwehr
3	Beugesynergismen auf Schmerzreiz
2	Strecksynergismen auf Schmerzreiz
1	Keine Reaktion auf Schmerzreiz
<u>Verbale Kommunikation</u>	
5	Orientiert, konversationsfähig
4	Konversationsfähig, desorientiert
3	Unzusammenhängende Worte
2	Unverständliche Laute
1	Keine verbale Reaktion
<u>Augenöffnen</u>	
4	spontan
3	Auf Aufforderung
2	Auf Schmerzreiz
1	Keine Reaktion

Tabelle 2 Bewertungstabelle zur Berechnung des Glasgow- Coma- Scale (nach ³)

13, so wird das Schädel-Hirn-Trauma als leicht eingestuft. Bei einer Score von 9-13 ist das Trauma als mittelschwer und bei einer Punktzahl von 8 und darunter als schwer einzustufen. Diese Klassifikation ist international weitgehend anerkannt¹⁹, hat jedoch auch einige Einschränkungen. So kann mit dem GCS zum Beispiel keine direkte Aussage über die Hirnstammfunktion gegeben werden und andere Verletzungen und Symptome, zum Beispiel vorbestehende neurologische Störungen wie Aphasie oder Augenverletzungen können die Beurteilbarkeit einschränken²⁰. Als Alternative kann die Bewertung über den sog. FOUR-Score erfolgen, der z.B. auch eine Beurteilung intubierter Patienten ermöglicht²¹.

Obwohl die klinische Einschätzung durch den Glasgow-Coma-Scale eine relativ gute Prognoseabschätzung ermöglicht, insbesondere bei schweren Schädel-Hirn-Traumen, kann man daraus keine Rückschlüsse auf die ursächliche Pathologie ziehen, was für eine spezifische, individuelle Therapieentscheidung notwendig wäre²². So konnte gezeigt werden, dass Patienten mit gleichem GCS- Score je nach Art und Ort der intrakraniellen Verletzung deutlich unterschiedliche Mortalitätsraten

aufweisen, wobei zum Beispiel der Nachweis einer Hirnstammbeteiligung oder einer intrakraniellen Blutung, insbesondere eines akuten Subduralhämatoms mit einer Prognoseverschlechterung einhergeht²³. Mittels moderner bildgebender Verfahren können die verletzten Hirnstrukturen relativ schnell und zuverlässig erkannt und somit der Schweregrad des SHT abgeschätzt werden. Zum Beispiel ermöglicht der Marshall-Score²⁴ durch die Beurteilung einer CT-Untersuchung in Bezug auf die Morphologie der inneren Liquorräume (als Maßstab für eine Schwellung) und die Evaluation von Läsionen nach Größe und Signalverhalten eine gute Prognoseabschätzung bei Erwachsenen. Limitationen bestehen bei Patienten mit mehreren gleichzeitig bestehenden intrakraniellen Verletzungen, bei denen die Einteilung schwierig und unter Umständen nicht eindeutig ist¹⁸.

Neben dem neurologischen Status und der Art der intrakraniellen Verletzung konnte für mehrere andere Faktoren ein Einfluss auf das Outcome nach SHT gezeigt werden. So haben zum Beispiel Personen über 65 Jahre eine schlechtere Prognose bezüglich der neurologischen Entwicklung. Des Weiteren konnte man auch für niedrigen Blutdruck (< 100mmHg systolisch)²⁵, Hypoxie (<90% Sauerstoffsättigung)²⁶ und Hyperglykämie (Blutglukosespiegel >160mg/dl innerhalb der ersten 24 Stunden nach Trauma)²⁷ einen negativen Effekt auf das Outcome nach Schädel-Hirn-Trauma nachweisen.

Insbesondere das leichte Schädel-Hirn-Trauma wird jedoch bei den oben genannten Klassifikationssystemen nicht ausreichend gut in seiner Bandbreite abgedeckt, weil es hier definitionsgemäß weder eine längerdauernde, erkennbare Bewusstseinsstörung noch signifikante Veränderungen in der CT- Untersuchung gibt²⁸. Da es aber auch das leichte Schädel-Hirn-Trauma Patienten in ihrer Leistungsfähigkeit stark beeinträchtigen kann²⁹, sind Prognosekriterien bei dieser Form des SHT Gegenstand aktueller Forschung³⁰.

Die Spätfolgen nach wiederholtem leichtem Schädel-Hirn-Trauma, wie sie zum Beispiel beim Boxen oder bei verschiedenen Kontaktsportarten auftreten, umfassen verschiedene Formen der Demenz. Dadurch entwickelt das SHT eine große gesundheitsökonomische Bedeutung³¹.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass aufgrund der Heterogenität des Schädel-Hirn-Traumas in Bezug auf Verletzungsschwere, Verletzungsmechanismus, Lokalisation und Art der intrakraniellen Verletzung, aber auch in Bezug auf Alter und Begleiterkrankungen der Betroffenen für eine möglichst genaue Prognoseabschätzung und Therapieplanung die

gleichzeitige Nutzung mehrerer Klassifikationsmodelle und die Bewertung unterschiedlicher Prognosefaktoren erforderlich ist. Diese wird aktuell mit dem sogenannten IMPACT- Score versucht³².

1.1.4 Pathophysiologie

Primärer Hirnschaden

Der Primärschaden entsteht durch die direkte Folge der Gewalteinwirkung auf das Gehirn. Daher ist der primäre Hirnschaden keiner kausalen Therapie zugänglich. Vor allem drei primäre intrakranielle Verletzungsarten lassen sich unterscheiden, wobei jedoch Mischformen möglich sind (Abb. 3).

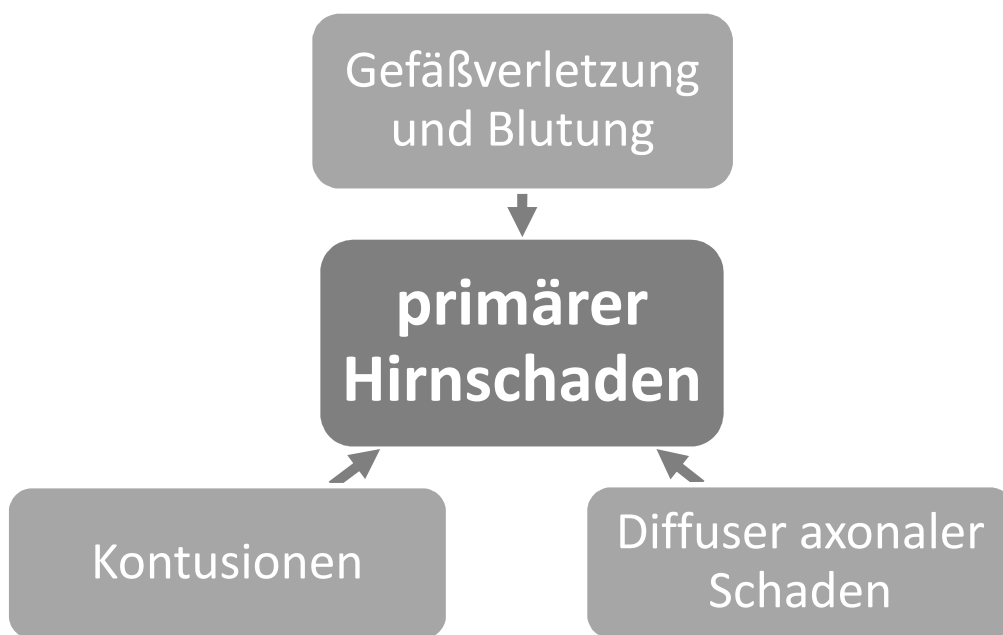


Abbildung 3 Zusammenfassende Darstellung der drei Komponenten des primären Hirnschadens

Eine Schädigung von Gefäßen mit einer daraus folgender Blutung wird je nach Lokalisation als epidural, subdural, subarachnoidal oder intraparenchymatös klassifiziert³³. Jede der genannten Blutungen kann zu einer Raumforderung und einer Druckbelastung des

Hirnparenchyms führen. Insbesondere im Fall eines Epiduralhämatoms können Blutungen u.U. aber auch erst nach einem symptomfreien Intervall zu einer klinischen Verschlechterung führen.

Als Ausdruck einer direkten Druck- oder Zugkrafteinwirkung auf das Gehirn können Nekrosen entstehen. Diese werden als Kontusionen bezeichnet³⁴ und entstehen zumeist an anatomischen Prädilektionsstellen wie den Temporalpolen oder den basalen Anteilen des Frontallappens³⁵. Derartige lokale Schädigungen gehen oft mit subarachnoidalen Blutungen einher und können zu einer Hirndrucksteigerung und sensomotorischen Ausfällen führen³⁶.

In etwa der Hälfte aller intra-axialen Traumata kommt es durch Zug an den Nervenfasern zu einem diffusen Axonschaden (DAI)³⁷. Der DAI entsteht vor allem durch Scherverletzungen und ist durch multifokale Läsionen in der weißen Substanz charakterisiert (Abb. 4)³⁸. Oftmals sind Patienten mit DAI komatös und haben eine schlechte Prognose³⁹. Das ursprüngliche Konzept, dass der DAI ausschließlich durch eine Zerreißung der neuronalen Axone entsteht, wurde inzwischen wieder verlassen, da das maximale Ausmaß des diffusen Axonsschadens erst nach bis zu 48 h erreicht wird, was auch für eine sekundäre Entstehung spricht^{39,40}.

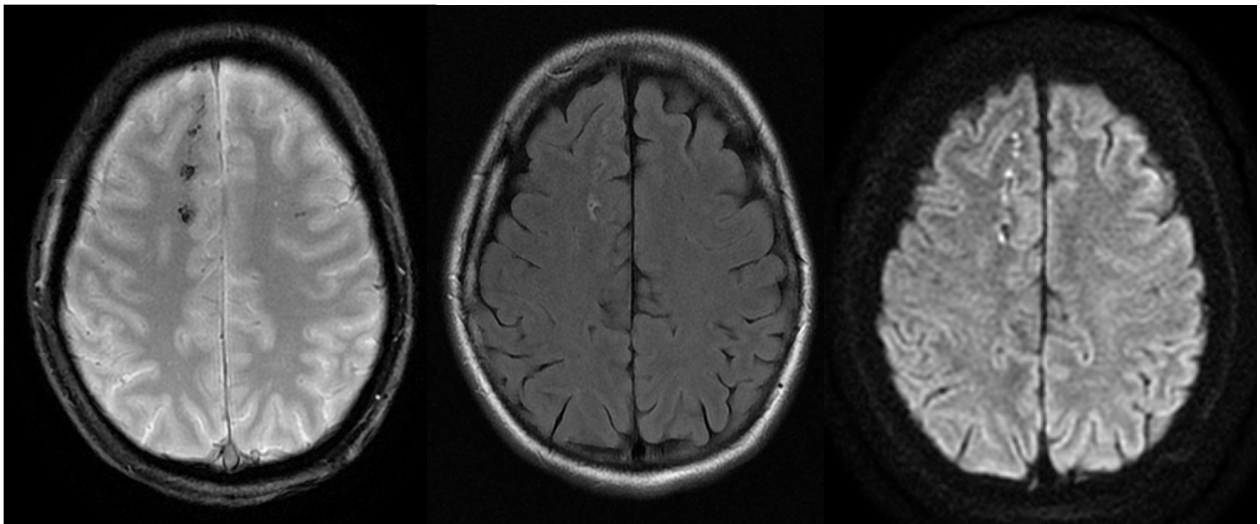


Abbildung 4 Beispiel für einen traumatisch bedingten diffusen axonalen Schaden in der MRT, charakterisiert durch meist linear angeordnete, subcortikale Mikroblutungen und Diffusionsrestriktionen (klinische Bildgebung, akquiriert in der Abt. für Neuroradiologie, Klinikum der LMU München, Großhadern)

Sekundärer Hirnschaden

Als Folge des primären Schaden kommt es ohne weiteres Trauma zu einer Größenzunahme der primären Läsion, dem sogenannten sekundären Hirnschaden. Es lassen sich hierbei grob vaskuläre, zelluläre und inflammatorische Vorgänge unterscheiden, die sich jedoch gegenseitig beeinflussen und so eine komplexe und variable Reaktion auf das Trauma ermöglichen.

Vaskuläre Effekte

Die zerebrale Mikrozirkulation wird durch ein komplexes System reguliert, welches unter dem Begriff der neurovaskulären Einheit (NVU, für engl. Neurovascular Unit, siehe Abb. 5) zusammengefasst wird⁴¹. Dieses funktionelle System umfasst die Endothelzellen, welche die innerste Schicht des Gefäßes darstellen (tunica intima) und mit ihren Zwischenzellkontakten die Blut-Hirnschranke bilden⁴¹. Diese innerste Schicht wird von der tunica media umgeben, welche in den Arteriolen aus einer oder mehreren Schichten von glatten Muskelzellen und in den Kapillaren aus Perizyten besteht.

Die äußerste Schicht der Gefäßwand wird tunica adventitia genannt und besteht bei den pialen Arteriolen aus bindegewebigem Material, das weitere Stabilität verleiht. Bei intraparenchymatösen Gefäßen fehlt häufig die bindegewebige Adventitia und die glatten Muskelzellen der tunica media haben unmittelbar Kontakt zu den umgebenden Zellen, zum Beispiel Astrozyten und Nervenzellen⁴². Vor allem Astrozyten können dabei die glatten Muskelzellen der Gefäßwände direkt beeinflussen und haben dadurch eine große Bedeutung für die Regulation der Perfusion⁴³.

Ziel dieser komplexen Organisation ist es zum einen, die Perfusion des Gehirns und damit die Energieversorgung unabhängig vom systemischen Blutdruck weitestgehend konstant zu, und zum anderen, besonders aktive Neurone flexibel und schnell mit Energie zu versorgen⁴⁴. Dies kann durch verschiedene Mechanismen erreicht werden. Eine Steigerung des lokalen Blutdrucks (z.B. durch einen erhöhten systemischen Blutdruck) führt beispielsweise zu einer Dehnung der Endothelzellen, die daraufhin Endotheline ausschütten. Diese Botenstoffe regen die glatten Muskelzellen zur Kontraktion, was zu einer Vasokonstriktion führt. Dies bewirkt

im Sinne einer einfachen negativen Rückkopplung eine Verringerung des lokalen Perfusionsdruckes⁴⁵. An den extraparenchymatösen Arteriolen ist zudem das autonome Nervensystem an der Regulation des Gefäßtonus beteiligt⁴⁶. Die intraparenchymatösen Arteriolen können direkt durch Interneurone und Astrozyten reguliert werden. Dies ermöglicht die Kopplung der Perfusion an den Energiebedarf der umgebenden Neurone, indem aktivierte Neurone entweder direkt oder über Astrozyten eine lokale Perfusionssteigerung generieren können^{42,43}.

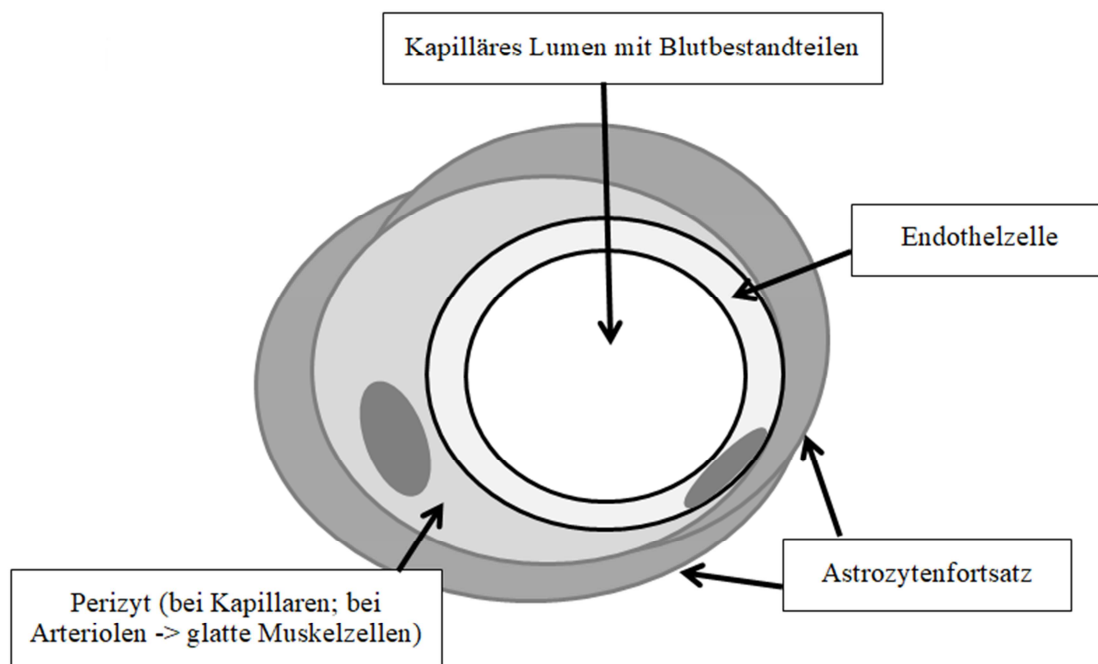


Abbildung 5 Schemazeichnung der Bestandteile der neurovaskulären Einheit. Die Endothelzellen kleiden das kapilläre Gefäßlumen aus (Tunica intima). Die Tunica media der Kapillaren wird durch Perizyten gebildet. Umgeben sind die Gefäße von Astrozyten, die mit ihren Fortsätzen die Tunica adventitia bilden. Nähere Erläuterungen siehe Langtext (Zeichnung modifiziert nach ^{47,48})

Diese komplexen Regulationsmechanismen können durch Schäden an den hieran beteiligten Zellen massiv gestört werden. Während glatte Muskelzellen relativ robust gegenüber einem direkten Trauma zu sein scheinen und unmittelbar danach keine signifikante Änderung der Morphologie zeigen⁴⁹, sieht man histomorphologisch bei allen anderen Zelltypen bereits unmittelbar nach dem Trauma Zeichen der Schädigung⁵⁰. In der Folge können sowohl durch

direkte Schäden der Zellmembranen oder durch eine gesteigerte Aktivierung, z.B. aufgrund freigesetzter exzitatorische Transmitter wie Glutamat (siehe unten), eine Vielzahl verschiedener vasoaktiver Substanzen freigesetzt werden. In aktivierten Astrozyten zeigt sich beispielsweise eine vermehrte Produktion des vasodilatierenden Stickstoffmonoxids (NO, für engl. nitric oxide), aber auch von vasokonstriktiven Substanzen wie Prostaglandin E2⁵¹ oder Epoxyeicosatriensäure^{42,43,52-54}. So kann je nach Verhältnis der freigesetzten vasoaktiven Stoffe sowohl eine Hypo- als auch zeitweise eine Hyperperfusion des betroffenen Gewebes entstehen⁵⁵⁻⁵⁸.

Weitere Störfaktoren für die Perfusion des Hirnparenchyms sind mechanisch zerstörte Gefäße, oft erkennbar an einer Hämorrhagisierung des umgebenden Hirngewebes⁴² oder bei größeren Schädigungen durch die oben genannten Arten einer intrakraniellen Blutung³³. Insbesondere subarachnoidale Blutauflagerungen sind ein großer Risikofaktor für die Entstehung eines Vasospasmus, also einer massiven Vasokonstriktion⁵⁹, die naturgemäß mit einer deutlichen Hypoperfusion einhergeht.

Auch durch lokale Mikrothromben kann die Durchblutung im Gefäß behindert werden^{60,61}: Störungen der Blutgerinnung lassen sich bei Schädel-Hirn-Traumen regelmäßig und manchmal auch disseminiert nachweisen. Als Folge kann eine intravaskuläre Gerinnung mit der Bildung von Mikrothromben auftreten, welche die Perfusion des Parenchyms weiter verschlechtern. Eine durch Hypoperfusion bedingte Ischämie des Hirngewebes ist mit einer schlechteren Prognose verbunden⁵⁸.

Eine direkte Schädigung von Endothelzellen führt zu einer primären Störung der Blut- Hirn-Schranke. Dies resultiert in einem primär vasogenen Ödem mit Austritt von Flüssigkeit in das Hirnparenchym. Die Störung der Blut-Hirn-Schranke ermöglicht auch die Infiltration von Leukozyten ins Hirnparenchym und damit deren Beteiligung an lokalen inflammatorischen Prozessen⁶²⁻⁶⁴.

Inflammatorische Prozesse

Die intrinsischen Immunzellen des Hirnparenchyms sind die Mikroglia, die die Fähigkeit zur Phagozytose besitzen und durch Antigenpräsentation andere Immunzellen regulieren können⁶⁵. Die direkt durch das SHT geschädigten Zellen setzen spezifische Signalmoleküle frei, die sog. damage-associated-molecular-pattern (DAMPs). Diese Moleküle können von Rezeptoren der Mikrogliazellen erkannt werden und diese aktivieren⁶⁶. Aktivierte Mikrogliazellen können je nach den lokalen Umweltbedingungen zu zwei verschiedenen Phänotypen differenzieren. Zum M1-Typ differenzieren sich die Zellen unter Einfluss von Lipopolysacchariden (LPS, Bestandteile der bakteriellen Zellwand) und Interferon- γ (IFN γ , von Immunzellen freigesetztes Glykoprotein)^{67,68} und synthetisieren dann vor allem pro-inflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) oder Tumornekrosefaktor α (TNF α), was zu einer Rekrutierung von weiteren Immunzellen, auch aus dem peripheren Blut, führt⁶⁶. Zum M2-Typ differenzieren sich die Zellen unter Einfluss von IL-4 oder IL-13⁶⁹. Der M2-Typ sezerniert vor allem anti-inflammatorische Signalmoleküle wie IL-10 und reduziert die Synthese von entzündungsfördernden Cytokinen wie den oben genannten IL-1 oder TNF α ⁶⁸. Die beiden beschriebenen Phänotypen von aktivierter Mikroglia sind jedoch nur Endpunkte einer Bandbreite von Ausprägungen. Die meisten Mikrogliazellen besitzen Eigenschaften von beiden Typen in unterschiedlicher Ausprägung⁶⁶. Des Weiteren ist der Phänotyp auch variabel über die Zeit, sodass eine Zelle die hauptsächlich sezernierten Signalmoleküle auch ändern kann, wobei die anti-inflammatorische M2-Ausprägung im Vergleich zum pro-inflammatorischen M1-Typ eher kurz besteht. Im Verlauf von ca. 1 Woche nach Trauma führt dies zu einer M1-dominierten und daher pro-inflammatorischen Ausprägung der Mikroglia⁷⁰.

Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine durch die Mikrogliazellen bewirkt eine Permeabilitätssteigerung der Blut-Hirn-Schranke und ermöglicht so einen Durchtritt von Immunzellen aus dem peripheren Blut ins Hirnparenchym⁷¹. Zeitlich als erstes infiltrieren neutrophile Granulozyten das geschädigte Gewebe und helfen bei der Phagozytose des Zelldetritus, setzen jedoch auch schädigende Substanzen frei wie zum Beispiel reaktive Sauerstoffradikale (ROS, engl. für reactive oxygen species)^{72,73}. Auch T-Zellen werden durch Mikroglia aktiviert, infiltrieren das Gewebe und sezernieren ihrerseits selbst Chemokine, die wiederum weitere Leukozyten, Lymphozyten und Monozyten in das geschädigte Areal

leiten⁷⁴. Insgesamt kommt es so durch positive Rückkopplungsmechanismen zu einer schnellen Immunantwort.

Neben Mikroglia und eingewanderten Leukozyten sind auch Astrozyten an der Regulation der Immunreaktion beteiligt. Aktivierte Astrozyten können sowohl pro-inflammatorische als auch neuroprotektive Substanzen sezernieren⁷⁵⁻⁷⁷. Des Weiteren verhindern sie die Ausbreitung der Immunreaktion auf gesundes Gewebe⁷⁸. Dies erfolgt zum einen durch eine Größenzunahme der Astrozyten mit der Ausbildung von Zellausläufern und zum anderen durch die Produktion von extrazellulärer Matrix, was insgesamt zu einer Abkapselung des betroffenen Areal führt^{68,79}. Durch die Kapsel wird das umliegende gesunde Gewebe geschützt, allerdings werden die Heilungs- und Reparaturmechanismen im abgekapselten Areal erschwert⁷⁹. Als Residuum der Astrozytenaktivierung nach Trauma bleibt daher meist eine Glianarbe zurück als Ausdruck einer unvollständigen Restitution ad integrum, während eine Hemmung der Astrozytenaktivierung die Narbenbildung verringern kann⁷⁹.

Insgesamt spielen Entzündungsvorgänge eine wichtige Rolle bei der Entstehung des sekundären Hirnschaden³⁹. Sie sind unentbehrlich bei der Entfernung von Zelldetritus und damit ein essenzieller Bestandteil des Heilungsprozesses in den betroffenen Arealen, wenn auch nach einer solchen Heilung zumeist eine Glianarbe zurückbleibt⁸⁰.

Zelluläre Prozesse

Alle beschriebenen pathophysiologischen Vorgänge stören die Homöostase von Zellen des Hirnparenchyms und können zu deren Schädigung und Tod führen.

Ein zentraler Pathomechanismus für Nervenzellen ist hierbei die Exzitotoxizität, eine Schädigung von Zellen durch übermäßige Aktivierung⁸¹. Von der Vielzahl der vorhandenen Neurotransmitter im Gehirn scheint vor allem Glutamat zur Exzitotoxizität beizutragen⁸².

Physiologischerweise wird Glutamat in präsynaptischen Vesikeln gespeichert und in Abhängigkeit eintreffender Aktionspotentiale freigesetzt (Abb. 6)⁸³. Eine direkte Schädigung der Zellmembran des Neurons kann zu einem unkontrollierten Ioneneinstrom in die präsynaptische Zelle und damit zu einer dauerhaften Depolarisation der Zellmembran führen. Dies bedingt an den Synapsen der Zelle eine übermäßige Freisetzung von Transmittern⁸².

Hinzu kommt, dass auch die Astrozyten, welche die Synapsen umgeben und normalerweise überwiegend für die Beseitigung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt verantwortlich sind⁸⁴⁻⁸⁶, ebenfalls geschädigt sein können und daher den exzitatorischen Transmitter nicht suffizient aus dem synaptischen Spalt entfernen. Diese beiden Prozesse zusammen führen zu einer Anreicherung von Glutamat an der Synapse und zu einer anhaltenden Aktivierung der Rezeptoren. Hierdurch kommt es über die ionotropen NMDA- (=N-Methyl-D-Aspartat) und AMPA-Rezeptoren (=α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid) zu einem Fluss von Kationen, insbesondere einem Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen in den postsynaptischen Anteil der nachfolgenden Nervenzelle, was zu einer Depolarisierung der Zellmembran und damit zu einem Aktionspotential führt^{87,88}. Insgesamt stellt dieser Prozess einen positiven Feedbackmechanismus dar, indem die aktivierte Zelle erneut Glutamat freisetzt und somit weitere Zellen aktiviert, während eine effektive Entfernung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt aufgrund der geschädigten Astrozyten nicht erfolgen kann⁸².

Neben der direkten Depolarisierung ist besonders der Einstrom von Calciumionen in die Zelle genauer zu betrachten, da die Ca^{2+} -Ionen nahezu auf alle zellulären Vorgänge regulierend einwirken können⁸⁹. Um diesen Zweck zu erfüllen, muss der intrazelluläre Calciumspiegel genau reguliert und niedrig gehalten werden. Dies erfolgt durch Entfernung der Ionen aus dem Cytosol nach extrazellulär oder in intrazelluläre Organellen wie die Mitochondrien oder das endoplasmatische Reticulum. Diese Aufgabe erfolgt vor allem durch die Ca^{2+} -ATPase, einem transmembranösen Enzymtransporter, der unter Verbrauch des intrazellulären Energieträgers Adenosintriphosphat (ATP) Calcium-Ionen entgegen einem Gradienten transportieren kann, und einem Natrium-Calcium-Austauscher (NCX, für engl. Natrium-Calcium-Exchanger), welcher einen Konzentrationsgradienten zwischen den Kompartimenten als Antrieb für den Calciumtransport nutzt⁸⁹. Letzterer ist auf einen ausreichend hohen Natriumgradienten angewiesen, der aktiv durch die Na^+/K^+ -ATPase aufrechterhalten werden muss⁹⁰. Mitochondrien besitzen einen weiteren Ca^{2+} -Transporter, der die benötigte Energie durch ein sogenanntes Uncoupling direkt aus der Atmungskette bezieht⁹¹, also durch ein Ablaufen der Prozesse der Atmungskette ohne die Produktion von ATP. Insgesamt ist die Regulierung des Calciumspiegels also ein aktiver Prozess, der viel Energie in Form von ATP verbraucht.

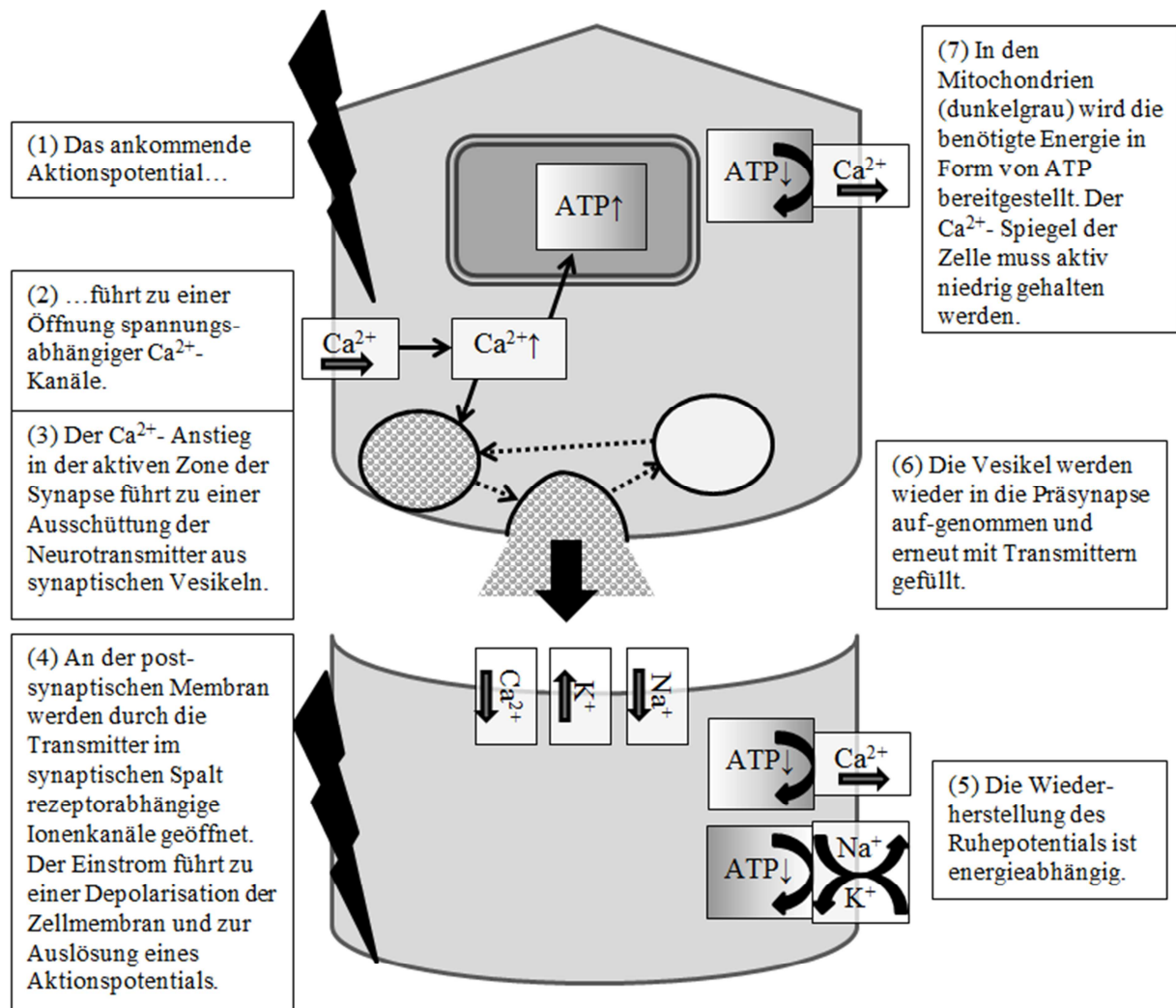


Abbildung 6 Physiologischer Ablauf der Signalübertragung an einer chemischen Synapse. Die Wiederherstellung und Aufrechterhaltung des Ruhezustands ist ein energieabhängiger Prozess. Bei Exzitotoxizität kommt es zu einer dauerhaften Depolarisation des präsynaptischen Neurons (1+2) und dadurch zu einer übermäßigen Transmitterausschüttung (3). Im Endeffekt steigt dadurch sowohl prä- als auch postsynaptisch der Energiebedarf (5+7). Nähere Erläuterungen siehe Text. (Abbildung modifiziert nach ^{92,93})

Insgesamt beträgt der durchschnittliche Energieverbrauch eines Neurons der grauen Substanz etwa $30 \mu\text{mol ATP/g Gewebe/Minute}$, was in etwa dem Energieverbrauch einer Beinmuskelfaser während eines Marathonlaufs entspricht⁹⁴. Hierbei wird der Großteil des Energieverbrauchs vom synaptischen Vesikelkreislauf verbraucht, also zur Ermöglichung der

synaptischen Übertragung. Rund 25% der Energie werden für das Weiterleiten von Aktionspotentialen aufgewendet.

Aufgrund der oben beschriebenen pathologischen Veränderungen nach einem Trauma kann es zu einer Mangelversorgung des Hirnparenchyms mit Glucose und Sauerstoff kommen⁹⁵. Dies führt zu einem Funktionsverlust der energieabhängigen Ionenpumpen, zu einem weiteren Einstrom von Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in die Zelle und einer weiteren Depolarisierung der Zellmembran. Die Depolarisierung der Zellmembran verursacht eine Ausschüttung von Neurotransmittern und damit eine Erregung der nachfolgenden Zelle.

Der Anstieg des Calciumspiegels in den Mitochondrien ist ein zentraler Punkt während des neuronalen Zelltodes. Mitochondrien sind von einer Doppelmembran umgeben, wobei die äußere Membran aufgrund einer großen Anzahl an Kanälen für Ionen bis 5kDa Größe sehr gut permeabel ist, also auch für Calcium-Ionen⁹⁶. Der Transport über die innere Membran erfolgt vor allem über einen Calcium-Uniporter, also einen spezifischen Ionenkanal für Ca^{2+} -Ionen⁹⁷. Insgesamt können die Mitochondrien eine große Menge an Calcium-Ionen aufnehmen und speichern. Sie spielen daher eine wichtige Rolle bei der Regulation der Calciumhomöostase der Zelle.

In den Mitochondrien führt ein Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg zu einer Aktivierung der Atmungskette. Dies führt zu einer gesteigerten Produktion von ATP als Reaktion auf die, durch den Calciumanstieg signalisierte, Aktivierung der Zelle⁹⁸. Bei der oxidativen Phosphorylierung, hier also der Produktion von ATP durch die Atmungskette, bei der die benötigte Energie aus Redox-Reaktionen gewonnen wird, entstehen als natürliches Nebenprodukt reaktive Sauerstoffmoleküle (ROS= engl. reactive oxygen species), vor allem Superoxidmoleküle ($\text{O}_2^{\cdot-}$) und Hydroxylradikale (OH^{\cdot})^{99,100}. Solche Radikale sind sehr reaktive Moleküle und werden normalerweise schnell durch antioxidantische Substanzen der Zelle gepuffert, um zu verhindern, dass Proteine oder die DNA geschädigt werden. Nach Schädel-Hirn-Trauma kommt es jedoch durch die anhaltende Ca^{2+} -bedingte Aktivierung der Atmungskette zu einer Überproduktion von ROS, die die zellulären Speicher an antioxidantischen Substanzen schnell aufbraucht. Diesen Zustand nennt man oxidativen Stress¹⁰¹.

Oxidativer Stress

Das Gehirn ist durch seinen hohen Energieumsatz besonders anfällig für das Entstehen von oxidativem Stress. Trotz seiner relativ zum Gesamtkörpergewicht geringen Masse erhält das Gehirn ca. 20% des Herzminutenvolumens und damit auch ca. 20% des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs¹⁰². Sauerstoff ist essentiell als das Endempfängermolekül für das energietragende Elektron in der Atmungskette. Ein relatives Überangebot an Sauerstoff ermöglicht so ein ständiges Funktionieren der Atmungskette, auch bei Prozessen oder in Zuständen, die besonders viel Energie benötigen.

Die bei der oxidativen Phosphorylierung primär entstehende ROS ist das Superoxid- Radikal $\bullet\text{O}_2^-$. Dies wird vor allem durch das Enzym Superoxid-Dismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) reduziert, kann jedoch auch mit Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxynitrid (ONOO^-) reagieren. Die beiden letztgenannten Moleküle bilden die Gruppe der sogenannten reaktiven Stickstoffspezies (RNS = engl. reactive nitrogen species). Trotz der großen Menge an entstehendem H_2O_2 fehlt in Neuronen das Enzym Catalase, das vor allem in Leber und Herz, die Reaktion von Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff katalysiert¹⁰³. Im Gehirn wird Wasserstoffperoxid auf drei verschiedene Arten entfernt (siehe schematische Übersicht in Abbildung 7): Zum einen erfolgt dies über den sogenannten Thioredoxin/ Peroxiredoxin-Weg. Hierbei wird das fehlende Elektron durch die Bildung einer Disulfidbrücke im Thioredoxinprotein generiert und dann über eine enzymatische Reaktion ersetzt, katalysiert durch die Thioredoxinreduktase. Als Elektronendonator fungiert hierbei NADPH^{104} (=Nicotinamadenindinukleotidphosphat), ein im Körper ubiquitäres Molekül und Reduktionsmittel. Zum zweiten werden die Elektronen über das Protein Glutathion (GSH) übertragen. Dies erfolgt ebenfalls über die Bildung einer Disulfidbrücke. Die oxidierte Form von Glutathion (GSSG) wird dann durch das Enzym Glutathionreduktase wieder reduziert, wobei ebenfalls NADPH als Elektronendonator dient¹⁰⁵. Ein dritter Weg ist die durch das Enzym Myeloperoxidase katalysierte Reaktion von H_2O_2 mit Chloridionen zu Hypochlorsäure oder Hypochlor-Ionen, oxidativ hoch wirksamen Molekülen, die an anderer Stelle z.B. Bedeutung in der Abwehr von Bakterien durch Immunzellen haben¹⁰⁶.

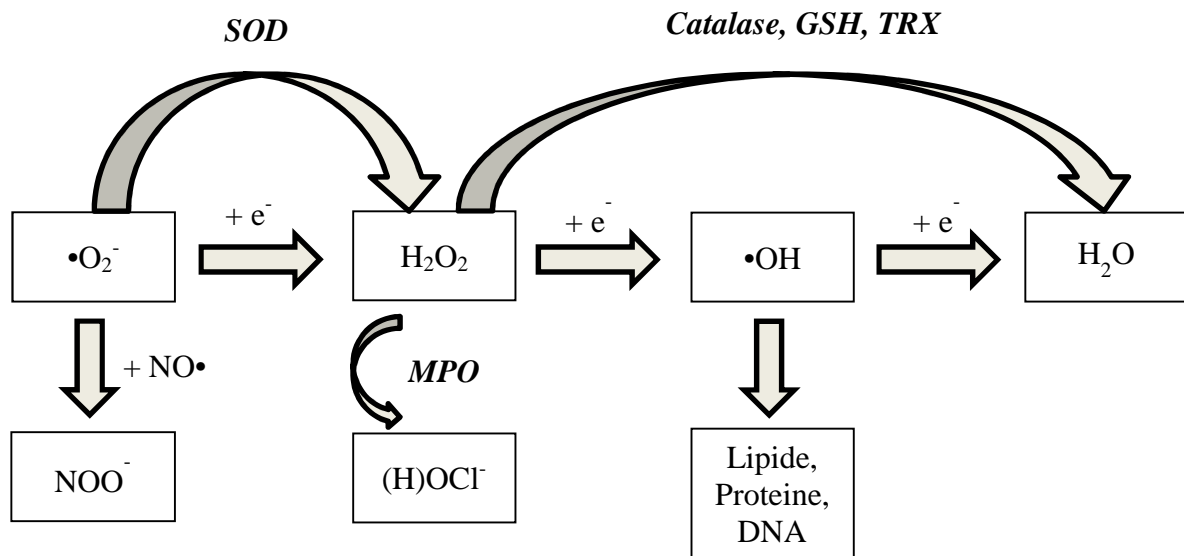


Abbildung 7 Zusammenfassende Darstellung der Reaktionswege von reaktiven Sauerstoffspezies. Erläuterungen siehe Langtext. SOD = Superoxid-Dismutase, GSH= Gluthathion, TRX = Thioredoxin, MPO = Myeloperoxidase (Abbildung modifiziert nach ¹⁰²)

Sollten diese enzymatischen Wege nicht ausreichend zur Verfügung stehen, reagiert H_2O_2 spontan mit den umliegenden Lipiden, Proteinen und DNA, und zerfällt nach Aufnahme eines Elektrons zu Wasser und dem hochaktiven Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$). Durch eine Schädigung der Lipide wird unter anderem die Membran der Mitochondrien durchlässiger, wodurch es zu einem Austritt von ROS und mitochondrialen Matrixproteinen in das Cytosol kommt. Dadurch werden mehrere Signalkaskaden des Zelltods ausgelöst⁹⁶ und es kann zu massiven Gewebeschäden kommen¹⁰².

Nekrose und Apoptose

Klassischerweise gilt die Apoptose als ein aktiver, Energie benötigender Vorgang, der nach festen molekularen Programmen abläuft¹⁰⁷. Dabei lassen sich charakteristische morphologische Veränderungen der sterbenden Zelle beobachten. Eine apoptotische Zelle stellt sich geschrumpft dar mit Ausstülpungen der Zellmembran, welche sich abschnüren

können und dann als „apoptotic bodies“ bezeichnet werden. Ferner ist eine sterbende Zelle durch eine ausgeprägte Kondensation des Chromatins als Ausdruck eines DNA-Abbaus gekennzeichnet¹⁰⁸⁻¹¹⁰.

<u>Nekrose</u>	<u>Apoptose</u>
Ursache: Aufbrauchen der Energiereserven und Funktionsverlust der Na-K-ATPase	Ursache: Signalkaskaden mit Aktivierung der Effektor-Caspasen
Zellschwellung durch Netto-Wassereinstrom	Zellschrumpfung durch Degeneration des Zellskeletts
Membranschädigung durch Lipidperoxidation	Intakte Membranen
Schwellung der Zellorganellen und des Zellkerns durch toxische Effekte	Zellorganellen und Zellkern schrumpfen und werden fragmentiert
Austreten von intrazellulären Molekülen und Auslösen einer Entzündungsreaktion	Phagozytose der fragmentierten Zellbestandteile, keine Inflammation

Tabelle 3 Zusammenfassende Darstellung der makroskopischen Unterschiede im Ablauf von Nekrose und Apoptose, modifiziert nach ¹¹¹

Die Apoptose kann auf zwei unterschiedlichen Wegen getriggert werden. Der intrinsische Weg der Apoptose beginnt mit dem Austritt von Proteinen aus dem Intermembranraum der Mitochondrien ins Cytosol, allen voran Cytochrom C^{96,95}. Zusammen mit ATP und Apaf-1 (=engl. apoptotic protease activating factor), bildet Cytochrom C das sogenannte Apoptosom, welches die Caspase-Kaskade aktiviert¹¹². Der extrinsische Weg wird durch extrazelluläre Signale getriggert, die Zelltod-Rezeptoren der Zelle aktivieren und konsekutiv intrazelluläre Reaktionen verursachen, z.B. die Aktivierung von Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α)¹¹³. Über den extrinsischen Weg können auch Signale an die Mitochondrien gegeben werden, sodass es zu einer synchronen Aktivierung des intrinsischen Weges kommen kann¹¹³. Als zentrales Effektormolekül der Apoptose wurde die Caspase-3 identifiziert, welche die Degeneration zellulärer Struktur- und DNA-assoziiierter Proteine bewirkt^{114,115}.

Durch den kontrollierten Ablauf gelangt, im Gegensatz zur Nekrose, kein intrazelluläres Material in den extrazellulären Raum. Es entsteht also keine Entzündungsreaktion⁸⁰. Nach einem SHT stellen sich apoptotische Zellen zu Beginn unauffällig dar und erst Stunden bis

Tage nach dem Primärtrauma kann man oben genannte morphologische Merkmale beobachten. Spätestens ab Tag 4 erreicht die Apoptose jedoch ein größeres Ausmaß als die gleichzeitig vorhandenen Nekrosevorgänge und überwiegt möglicherweise auch in der Folgezeit^{80,116}. Diese Tatsache ist insofern von Bedeutung, als dass dadurch ein therapeutisches Zeitfenster entsteht, sofern es gelänge, die Apoptose zu hemmen.

Im Gegensatz zur Apoptose gilt die Nekrose klassischerweise als ein passiver Vorgang. Als typisches morphologisches Merkmal ist hier die ödembedingte Schwellung der Zelle und deren Organellen beschrieben, die aufgrund einer Funktionsstörung der Na^+/K^+ -ATPase entsteht und im Verlauf zu einer Funktionsstörung der Membranen und zum Platzen der Zelle führen kann¹¹⁷. Infolgedessen wird intrazelluläres Material freigesetzt, was zu einer inflammatorischen Reaktion⁸⁰. Nach dieser klassischen Ansicht sind Nekrosevorgänge nicht unmittelbar beeinflussbar, sondern nur durch ein Ausschalten der auslösenden Faktoren zu verhindern¹¹⁸.

Aufgrund neuerer Erkenntnisse muss diese klassische Einteilung jedoch um mehrere Misch- und Zwischenformen erweitert werden¹¹⁹. So gibt es zum Beispiel eine Caspase-unabhängige Form der Apoptose, genauso wie kontrollierte Formen der Nekrose¹¹⁸. Die kontrollierte Nekrose erfolgt über verschiedene Signalkaskaden. So erfolgt z.B. bei der sog. Nekroptose eine Peroxidation der Membranlipide und eine Porenbildung in den Membranen, was zu einer deutlichen Permeabilitätssteigerung und dadurch zu einem Nettowassereinstrom (Zellschwellung) führt¹¹³. Diese Variationen des Zelltodes sind im Moment Gegenstand vieler Forschungsprojekte, sollen an dieser Stelle jedoch aus Rücksicht auf das Ausmaß des Themas nicht weiter behandelt werden.

1.2 Lipoxygenasen (LOX)

1.2.1 Lipidperoxidation

Bei übermäßiger Produktion und Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffradikalen können andere intrazelluläre Moleküle geschädigt werden. Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Oxidation von Lipiden der Zellmembran, die die Integrität der Membranen empfindlich stören kann und damit einen großen Beitrag zur Permeabilitätsänderung der Membran und letztlich zum Zelltod leistet¹²⁰.

Eine Lipidperoxidation durch reaktive Radikale geschieht zusammengefasst in drei Phasen¹²¹:

- (1) Die Initiation, in der durch das reaktive Radikal ein Elektron aus einer Methylengruppe gelöst wird. Hierbei erleichtert das Vorhandensein einer angrenzenden Doppelbindung den Entzug eines Elektrons, da es die C-H- Bindung der Methylengruppe schwächt. Dieser Umstand macht mehrfach ungesättigte Fettsäuren besonders anfällig für Lipidperoxidation. Als Ergebnis entsteht ein Lipidradikal mit einem freien Elektron an einem Kohlenstoffatom, während das ursprüngliche Radikal durch das gewonnene Elektron neutralisiert wird.
- (2) Die Propagationsschritte, in denen es zu einer intramolekularen Umverteilung der Elektronen (und damit der Doppelbindungen) kommt. Hiernach folgt eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff, wodurch ein Lipidperoxyradikal entsteht. Die weiteren Schritte hängen nun von dem Molekül ab, von dem das Lipidperoxyradikal sein benötigtes Elektron nimmt. Eine Reaktion mit einem weiteren Lipid führt zu einer Kettenreaktion, indem die Radikalisierung und die intramolekulare Elektronumverteilung immer weitere Lipide betreffen.
- (3) Die Terminierung, in der die Lipidradikale entweder mit anderen Radikalen oder mit Radikalfängern, wie z.B. Vitamin E, reagieren und sich so neutralisieren.

Je nach betroffenem Lipid, auslösendem Radikal und der Dauer der Kettenreaktion gibt es bei der unkontrollierten Lipidperoxidation eine Vielzahl von möglichen Produkten, von denen einige auch direkt zelltoxisch sind¹²². Eine unkontrollierte Lipidperoxidation kann so auf mehrere Wege eine ausgeprägte Zellschädigung bewirken, sowohl durch Schädigung der Membranen als auch durch Schädigung von DNA oder Proteinen.

Lipidperoxidation kommt jedoch in kontrollierter Form auch natürlicherweise in der Zelle vor und besitzt eine wichtige Rolle für die Beschaffenheit der Zellmembran¹²³ und die Generierung intrazellulärer Signalmoleküle¹²⁴. Hierbei nehmen die Lipoxygenasen eine zentrale Rolle ein.

1.2.2 Aufbau und Funktion

Lipoxygenasen sind Enzyme, die in Säugetieren und Pflanzen ubiquitär vorkommen und auch in Pilzen und einigen Bakterien gefunden wurden¹²⁵. Obwohl die Aminosäuresequenz sich zum Teil deutlich zwischen den einzelnen Zweigen des phylogenetischen Stammbaums unterscheidet, zeigt sich die dreidimensionale Struktur des Proteins sehr konstant¹²⁶. Alle Isoformen der Lipoxygenase bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette, die sich zu einer Struktur mit zwei Domänen auffaltet¹²⁷, von denen die N-seitige deutlich kleiner ist und funktionell die Membranbindung ermöglicht, während die C-seitige Domäne das katalytische Zentrum enthält. Die C-Domäne besitzt in zwei langen Helices vier der insgesamt bis zu sechs Bindungsstellen für die Eisenatome, die fünfte stellt das C-terminale Isoleucin dar und eine mögliche sechste kann statt Eisen von Wassermolekülen besetzt sein¹²⁸ (siehe Abb. 8).



Abbildung 8 Struktur der Lipoxygenase-5 im Komplex mit Arachidonsäure im reaktiven Zentrum (schwarzer Pfeil). Das Eisenatom im reaktiven Zentrum ist durch einen schwarzen Punkt markiert (Abbildung modifiziert aus der Molecular Modelling Database¹²⁹)

Lipoxygenasen katalysieren die positionsspezifische Dioxygenierung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die einen *cis,cis*-1,4-Pentadien-Anteil besitzen¹³⁰. Hauptsubstrate sind die essentiellen mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie z.B. Arachidonsäure, Linolsäure und Linolensäure¹³¹, wobei im menschlichen Organismus – im Gegensatz zu Pflanzen – die Arachidonsäure als Substrat den größten Anteil darstellt¹²⁵. Als Produkte entstehen dabei je nach Substrat und LOX-Isoform unterschiedliche Lipidmediatoren wie Leukotriene oder Lipoxine¹³².

Auf welche Weise die Positionsspezifität der katalysierten Reaktion zustande kommt, ist noch nicht abschließend geklärt. Für den Menschen wird eine ortsbezogene Theorie propagiert. Demnach binden sich die Substrate mit dem Methylen in die Bindungstasche. So hängt die Stelle der Dehydrogenierung und damit nachfolgend auch der Oxygenierung von der Tiefe der Bindungstasche ab und ist demnach je Isoform konstant und spezifisch^{133,134}.

1.2.3 Katalysierte Reaktionen

Wie bereits oben erwähnt, sind die Produkte aus den LOX-katalysierten Reaktionen äußerst vielfältig. Der Übersichtlichkeit halber soll hier nur auf die vorherrschenden Reaktionen im menschlichen Organismus eingegangen werden. Für Informationen über die Lipoxygenasen im Pflanzenreich stehen mehrere Übersichtsarbeiten zur Verfügung¹³¹.

Lipoxygenasen katalysieren drei verschiedene Reaktionstypen¹³⁵:

- (1) Die Dioxygenase-Reaktion, also die Übertragung beider Atome eines Sauerstoffmoleküls auf das Substrat ($R-H + O_2 \rightarrow R-OOH$). Dabei entstehen spezifische Hydroperoxide einer freien Fettsäure¹²⁵. Das primäre Reaktionsprodukt der Lipoxygenasereaktion aus Arachidonsäure ist die hydroperoxyeicosatetraenoische Säure (HpETE)¹³¹.
- (2) Eine Hydroperoxidase-Reaktion ($R-OOH + e^- \rightarrow R-O^\cdot + OH^-$). Dies ist faktisch die Aktivierungsreaktion für das Enzym. Durch die Oxidation eines Lipidhydroperoxids wird das Eisenatom im katalytischen Zentrum von Fe^{2+} zu Fe^{3+} reduziert, welches z.B. für die Dioxygenierung als Oxidans fungiert¹³⁶.

- (3) Eine Epoxyleukotriensynthase-Funktion, die aus HpETE durch erneute Dehydrierung des Lipids eine Epoxidkonfiguration bildet (s.u.)

Die dabei entstehenden Produkte sind Signalmoleküle, die entweder Teil einer Signalkaskade sind oder selbst als direkter Effektor wirken.

1.2.4 12/15- Lipoxygenase (12/15-LOX)

Die zweifache Nummerierung dieser Lipoxygenase rührt daher, dass die Retikulozytentyp-15-LOX und die Leukozytentyp-12-LOX eine sehr hohe phylogenetische Verwandtschaft aufweisen^{137,138,63}. Dies äußert sich in einer sehr ähnlichen Struktur, fast identischer Substratspezifität und Enzymkinetik sowie einer ähnlichen Genregulation¹³⁹⁻¹⁴¹. Die Gensequenzen beider Gene stimmen zu über 99% überein, was auf eine evolutionäre Entstehung durch Genduplikatur hinweist¹⁴².

Im Jahre 1997 konnte eine zweite Art von 15-Lipoxygenasen im Menschen isoliert werden. Diese kommt vor allem in der Haut, Prostata, Lunge und Cornea vor und wird als Epidermistyp-15-LOX bezeichnet. Allerdings unterscheidet sich die Epidermistyp-15-LOX (-2) deutlich von den Retikulozytentyp-15-LOX (-1) hinsichtlich der Proteinstruktur und den enzymatischen Eigenschaften. Ferner wurde das Enzym bisher nur in den o.g. Geweben nachgewiesen, während PCR-Tests in einer Reihe anderer Gewebearten, inklusive Leukozyten, negativ waren¹⁴³. Die Entsprechung zur Epidermistyp-15-LOX in der Maus die 8-LOX¹⁴⁴.

Substrate und Reaktionsprodukte

Die 12/15-LOX hat eine sehr große Bandbreite an möglichen Substraten, was daher rührt, dass alle ω 3- und ω 6- Fettsäuren enzymatisch prozessiert werden können, also ungesättigte Fettsäuren, bei denen die erste Doppelbindung am dritten bzw. am sechsten Kohlenstoffatom liegt (vom Omega-Ende gezählt, dem Kohlenstoffatom, das von der Carboxylgruppe am weitesten entfernt ist). Die LOX können ihre Substrate sowohl in freier als auch in veresterter Form, z.B. als Teil der Zellmembranen, prozessieren¹³⁵. Als biologisch einfachstes Substrat

kann die freie Linolsäure angesehen werden, die durch Dioxygenierung in 9Z,11E-hydroperoxy-octadecadiensäure (HpODE) umgewandelt wird¹⁴⁵. Wenn freie Arachidonsäure als Substrat fungiert, entsteht als Produkt eine Hydroperoxy-5Z,8Z,11Z,13E-eicosatetraensäure (HpETE). HpETE wird in der Zelle sehr schnell zu Hydroxyeicosatetraensäure (HETE) reduziert¹⁴⁶ (siehe Abb. 9 und Abb. 10).

Die humanen Leukozytentyp-12-LOX und Retikulozytentyp-15-LOX sind dual-spezifisch, d.h. die katalysierte Reaktion kann sowohl am Kohlenstoffatom C12 als auch an C15 des Substrates stattfinden¹⁴⁷. Somit entstehen als Produkte sowohl 12-HpETE als auch 15-HpETE sowie als reduzierte Formen 12-HETE und 15-HETE.

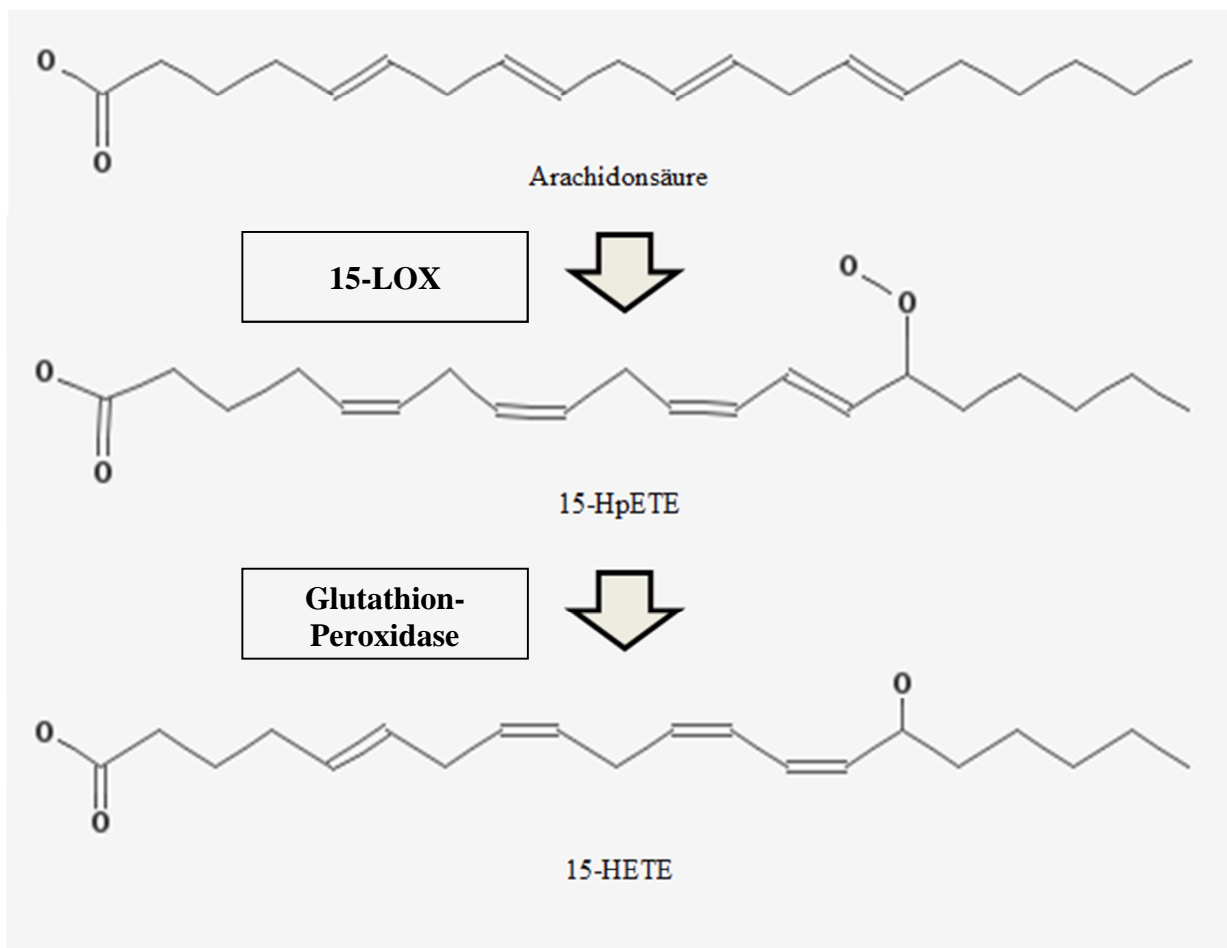


Abbildung 9 Enzymatische Prozessierung von Arachidonsäure durch 15-LOX. Durch die Dioxygenierung entsteht 15-HpETE, welches z.B. durch die Glutathion-Peroxidase zu 15-HETE reduziert wird (Erläuterungen siehe Langtext; Abbildungen modifiziert aus der Molecular Modelling Database¹⁴⁸⁻¹⁵⁰)

Biologische Rolle der 12/15-Lipoxygenasen

HETEs besitzen vielfältige Funktionen, welche aktuell noch nicht vollständig geklärt sind. Während die duale Spezifität der 12-LOX und der 15-LOX mehrere Reaktionsprodukte ermöglicht, sind die Wirkungen dieser Produkte je nach Isoform durchaus spezifisch.

In Thrombozyten zum Beispiel besitzt 12-HETE eine regulatorische Wirkung auf die Blutgerinnung. Die Studienlage bescheinigt 12-HETE hierbei sowohl eine prothrombotische als auch eine antithrombotische Wirkung, je nach dem Auslöser für die Thrombozytenaggregation¹⁵¹⁻¹⁵³. So inhibiert 12-HETE die Bindung von Tromboxan A₂ (TXA₂), einem prothrombotischen Signalmolekül, an den entsprechenden Rezeptor, was vor allem die durch Arachidonsäure getriggerte Form der Thrombozytenaggregation hemmt¹⁵⁴. Im Gegensatz dazu fördert 12-HETE die von Thrombin getriggerte Form der Thrombozytenaggregation durch eine intrazelluläre Calciumfreisetzung¹⁵⁵. Als weitere interessante Wirkung der HETE wurde eine Beteiligung als präsynaptischer second messenger in der neuronalen Signalübertragung gezeigt, wodurch mittels einer direkten Wirkung auf Kalium-Kanäle eine Regulation der synaptischen Transmission erfolgt¹⁵⁶. Auch in der Reifung der roten Blutkörperchen (Erythropoese) spielen die Produkte der 12/15-LOX eine Rolle, da sie an dem hier wichtigen Schritt der Degradation der Mitochondrien beteiligt sind^{157,158}. Hierbei führt die 12/15-Lipoxygenase zu einer direkten Störung der Zellmembran, was eine Änderung des mitochondrialen pH-Wertes und dadurch die Degradation der Mitochondrien bewirkt¹⁵⁹. Mehrere Studien bescheinigen der 12/15-Lipoxygenase des Weiteren eine regulatorische Wirkung bei Entzündungsvorgängen. So inhibiert 15-HETE die Superoxidbildung und Superoxidexozytose in aktivierten Leukozyten¹⁶⁰ sowie die Migration von aktivierten Leukozyten durch das Endothel¹⁶¹ und bewirkt eine deutliche Reduktion der Substrataffinität von Leukotrienoberflächenrezeptoren auf B4-Leukozyten¹⁶². Insgesamt ist die Wirkung der 12/15-LOX also eher als anti-inflammatorisch einzustufen. Die Fähigkeit der 12/15-Lipoxygenasen, auch Zellmembranen zu oxygenieren, lässt eine Beteiligung in Apoptosevorgängen vermuten, was auch bereits in mehreren Studien gezeigt werden konnte¹⁶³⁻¹⁶⁶.

1.2.5 5- Lipxygenase (5-LOX)

Die Lipxygenase-5 wurde Ende der 1970er Jahre zum ersten Mal in Leukozyten beschrieben¹⁶⁷. Es gelang seither, dass Enzym in mehreren Säugetierspezies nachzuweisen, u.a. im Menschen, in der Ratte und in der Maus¹⁶⁸. Die Aminosäuresequenz der 5-Lipxygenasen stimmt zwischen den Spezies zu über 90% überein^{169,170} und auch im Hinblick auf Substratspezifität und Enzymkinetik sind die Proteine fast identisch.

Substrate und Reaktionsprodukte

Die bekanntesten Produkte der 5-Lipxygenasen sind die Leukotriene. Die Synthese der Leukotriene beginnt mit der durch die 5-LOX katalysierte klassische Lipxygenierung von Arachidonsäure am Kohlenstoff C5, wobei als Produkt 5(S)-hydroperoxy-6-trans-8,11,14-cis-eicosatetraensäure (5-HpETE) entsteht¹³² (siehe Abb. 10). Die Aktivität der 5-LOX wird dabei durch das 5-lipxygenase-activating-protein (FLAP) verstärkt, welches zwar selbst keine enzymatische Wirkung besitzt, jedoch die Affinität der 5-LOX zu ihren Substraten erhöht¹⁷¹.

Im zweiten Schritt wird durch dieselbe Lipxygenase eine Dehydration am Kohlenstoffatom C7 katalysiert^{172,173}, wodurch eine Radikalwanderung ausgelöst wird und ein Umklappen der bestehenden Doppelbindungen erfolgt, sodass nun eine 7,9-trans-Konfiguration entsteht. Anstatt einer weiteren Oxygenierung mit einem neuen Sauerstoffatom bindet sich das frei gewordene Radikal jedoch nun an das bereits im ersten Schritt eingefügte Sauerstoffatom, sodass eine Epoxidkonfiguration mit Bindung des Sauerstoffs an die Kohlenstoffatome C5 und C6 entsteht^{174,175}. Das entstehende Produkt ist das Leukotrien A₄ (LTA₄), welches nun entweder von der LTA₄-Hydrolase oder von der LTC₄-Synthase weiterverarbeitet wird. In der LTA₄-Hydrolase katalysierten Reaktion entsteht eine Struktur mit einer 12R-Konformation und einer 6-cis-8-trans-10-trans-Konfiguration der angrenzenden Doppelbindungen (Leukotrien B₄)¹⁷⁶. Die LTC₄-Synthase konjugiert das LTA₄ mit Glutathion und bildet Leukotrien C₄, welches zu Leukotrien D₄ (LTD₄) weiterverarbeitet wird¹⁷¹.

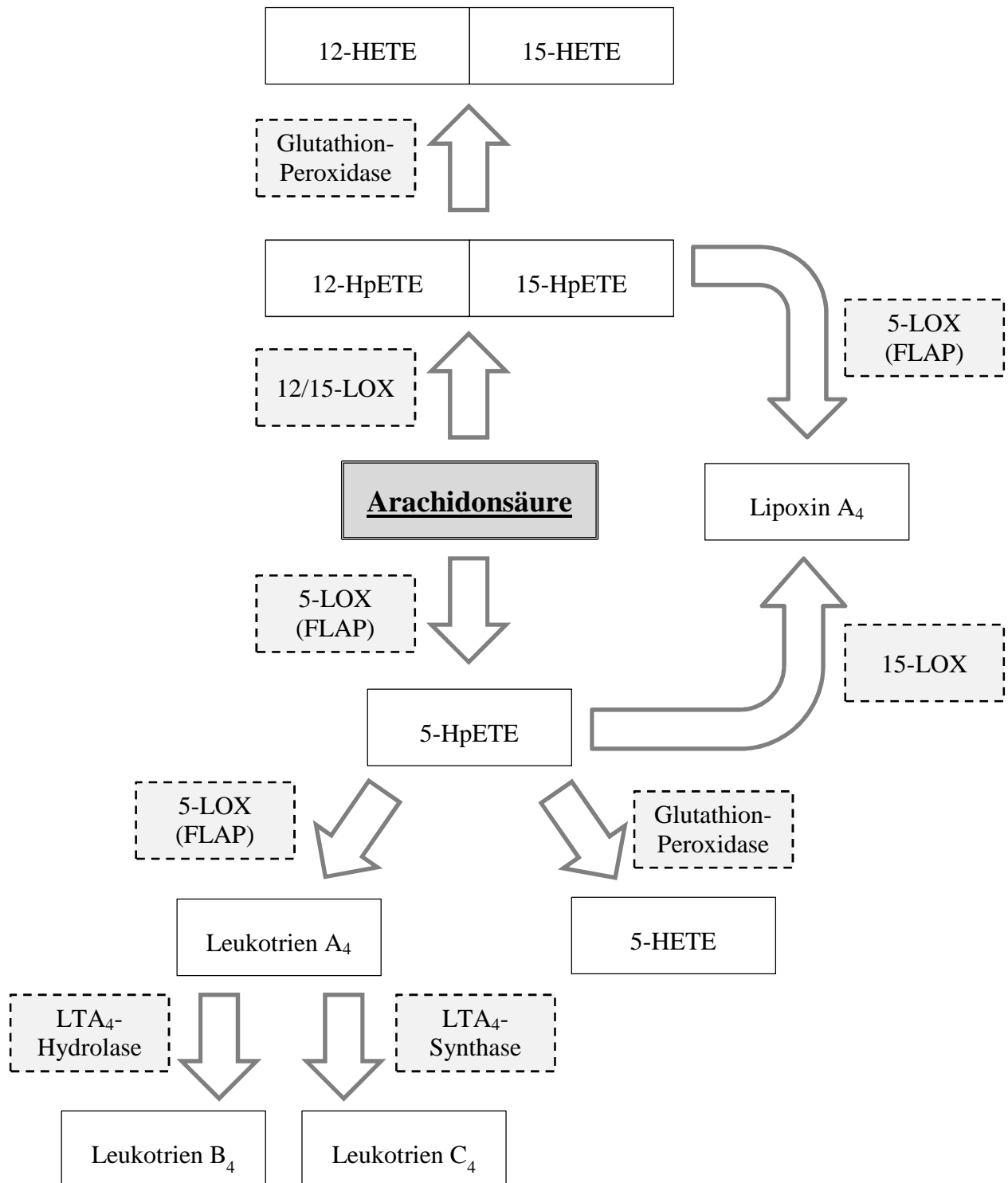


Abbildung 10 Zusammenfassende Darstellung der im Langtext beschriebenen Reaktionswege und Produkte der 12/15-LOX und der 5-LOX, ausgehend von Arachidonsäure als Substrat

Biologische Rolle der 5-Lipoxygenasen

Einmal gebildet, wirken die Leukotriene über die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Leukotrien-Rezeptoren auf Immunzellen und Endothelien. Die Rezeptoraktivierung führt dabei im Cytosol zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels und einer gleichzeitigen Verringerung des Spiegels von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem wichtigen intrazellulären second messenger¹⁷¹. Insgesamt fördern die Leukotriene für viele Untergruppen von Leukozyten den Übertritt ins Gewebe und die Immunfunktion^{177,178}. So ist Leukotrien B₄ (LTB₄) ein starkes Chemokin für Neutrophile, fördert die Monozytenmigration und führt zu einer Ausschüttung von Interleukin-6¹⁷⁹⁻¹⁸¹. Des Weiteren stimuliert LTB₄ auch differenzierte T-Zellen zur Migration¹⁸² und zur Ausschüttung von Cytokinen¹⁸³. Insgesamt lässt sich LTB₄ also eine deutliche pro-inflammatorische Wirkung bescheinigen.

LTD₄ spielt eine große Rolle in der Pathogenese des Asthmas. Es induziert eine Vielzahl der typischen Reaktionen beim Asthmaanfall wie z.B. die Bronchuskonstriktion, verstärkte Schleimbildung und die Erhöhung der vaskulären Permeabilität¹⁸⁴.

Im Gegensatz zu den gerade besprochenen Leukotrienen besitzt Lipoxin A₄ (LXA₄) eine Vielzahl von anti-inflammatorischen Wirkungen, vor allem in Bezug auf die Granulozytenaktivierung und -migration¹⁸⁵. Es kann zudem die Wirkung von LTD₄ blockieren¹⁸⁶. Stattdessen wirkt LXA₄ aktivierend auf Monozyten¹⁸⁷. Die Bildung von Lipoxin A₄ erfordert enzymatische Schritte der 5-LOX und der 15-LOX zur Bildung, wobei die Reihenfolge der zwei Reaktionsschritte nicht von Bedeutung ist.

Zusammenfassend lässt sich den Produkten der Lipoxygenase-5 eine deutliche inflammatorische Wirkung bescheinigen. In Verbindung mit dem ubiquitären Vorkommen im menschlichen Organismus ist die LOX-5 eines der zentralen Enzyme in der Regulation von Entzündungsvorgängen.

1.2.6 Lipoxygenasen im zentralen Nervensystem

An Entzündungsvorgängen im Gehirn sind alle Zelltypen beteiligt, also sowohl Neurone als auch Astro-, Oligodendrozyten und Mikroglia. In all diesen Zelltypen lassen sich Lipoxygenasen nachweisen¹⁸⁸. Diese werden, wie die Cyclooxygenasen und die Phospholipase-A2 (PLA₂), bei Entzündungsvorgängen im Gehirn aktiviert¹⁸⁹. In Neuronen kann die PLA₂ über Rezeptoren direkt oder über G- Proteine aktiviert werden¹⁹⁰. Dies führt zu einer erhöhten Konzentration an Arachidonsäure und damit einer vermehrten Verfügbarkeit an Substraten für die LOX, sowohl bei normaler neuronaler Aktivität als auch bei Exzitotoxizität. Die meisten Produkte der Lipoxygenasen spielen eine Rolle in der Entstehung und der Regulation von inflammatorischen Prozessen. Die von der LOX-5 gebildeten Leukotriene, allen voran LTB₄, besitzen auch im zentralen Nervensystem die oben beschriebenen pro-inflammatorischen Wirkungen wie z.B. die Chemokinwirkung auf Granulozyten und sind daher in der Initiation und der Aufrechterhaltung von Entzündungsvorgängen von großer Bedeutung. Im Gegensatz dazu sind die von der LOX-12/15 gebildeten Lipoxine eher als anti-inflammatorisch einzustufen, was ihre Bedeutung in der Termination einer Entzündungsreaktion erklärt¹⁹¹.

Die Aktivierung von Lipoxygenasen, und ebenso der verwandten Cyclooxygenasen, führt, wie oben beschrieben, zu einer Bildung von freien Radikalen im Sinne einer Lipidperoxidation. Diese können die Funktion von Neuronen durch Schädigung der Membranproteine, der Ionenkanäle oder der Rezeptoren deutlich einschränken¹⁹¹. Insgesamt kommt es zu einer Zunahme der Konzentration an freien Radikalen und damit auch zu einer Zunahme von oxidativem Stress. Des Weiteren inhibieren die gebildeten Hydroperoxide den natürlichen Metabolismus der Phospholipide¹⁹², was eine weitere Schädigung der Membranen bewirken kann.

Die Lipidperoxidation, sowohl enzymatisch als auch nicht-enzymatisch, hat im Gehirn aus mehreren Gründen eine besondere Bedeutung¹⁹³. Zum einen liegt dies an dem, im Verhältnis zum Cytosol, großen Anteil von Membranen in Neuronen¹⁹⁴. Als zweite Ursache lässt sich der hohe Energieumsatz und die damit verbundene hohe Konzentration an ROS aus der Atmungskette nennen¹⁹⁵. Des Weiteren sind im Gehirn hohe Spiegel an Eisen und anderen Redox-aktiven Metallen zu finden, welche das Oxidationspotential auch enzymungebunden erhöhen, was sich durch zusätzliche Eisenansammlungen, z.B. durch Austritt von

Hämoglobin aus den Blutgefäßen bei Trauma, weiter verstärken kann^{196,197}. Zusammen mit der schlechten bis fehlenden Regenerationsfähigkeit von Neuronen sind diese Faktoren dafür verantwortlich, dass Neurone und damit das Gehirn besonders anfällig sind für Störungen der Lipidperoxidation¹⁹³. Aus diesen Gründen haben die Lipoxygenasen im Gehirn durch ihre enzymatische Regulation der Lipidperoxidation eine große Bedeutung.

Neben den inflammatorischen Wirkungen haben die Lipoxygenasen auch andere Funktionen im zentralen Nervensystem. So beeinflussen beispielsweise HETEs die synaptische Aktivität und Effizienz, indem sie die Transmitterausschüttung moduliert¹⁹¹. Hierbei scheint vor allem 12-HETE als retrograder Transmitter zu wirken, der im präsynaptischen Neuron eine verminderte Freisetzung von Glutamat bedingt, indem der durch Depolarisation bedingte Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} - Spiegels verzögert und vermindert wird¹⁹⁸. Hierdurch kann die 12-Lipoxygenase über 12-HETE eine sogenannte Long-Term-Depression bewirken, also eine Verminderung der Signalübertragung in der Synapse über einen gewissen Zeitraum¹⁹⁹.

Aufgrund ihrer breit gefächerten Wirkungsweise liegt die Vermutung nahe, dass die Lipoxygenasen bei einer Vielzahl von Erkrankungen des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle spielen.

1.3 Rolle von LOX-Inhibitoren in-vitro

In Vorarbeiten unserer Kollaborationspartner der Arbeitsgruppe von Prof. Culmsee an der Philipps-Universität Marburg wurde die Rolle der LOX-5 und der LOX-12/15 beim durch reaktive Sauerstoffspezies bedingten Zelltod neuronaler Zellen genauer charakterisiert²⁰⁰. Es konnte in-vitro gezeigt werden, dass die Inhibition der LOX-12/15 das Überleben neuronaler Zellen nach einem durch Glutamat bedingten Schadens steigert. Dies betrifft sowohl hippokampale HT-22-Zellen als auch primäre kortikale Neurone (siehe Abb. 11), wenn auch auf geringfügig unterschiedliche Weise, da sich die Zelltodmechanismen der beiden Zellreihen unterscheiden. Dies liegt vor allem an dem massiven NMDA-Rezeptor-bedingten Calcium-Einstrom in primäre Neurone.

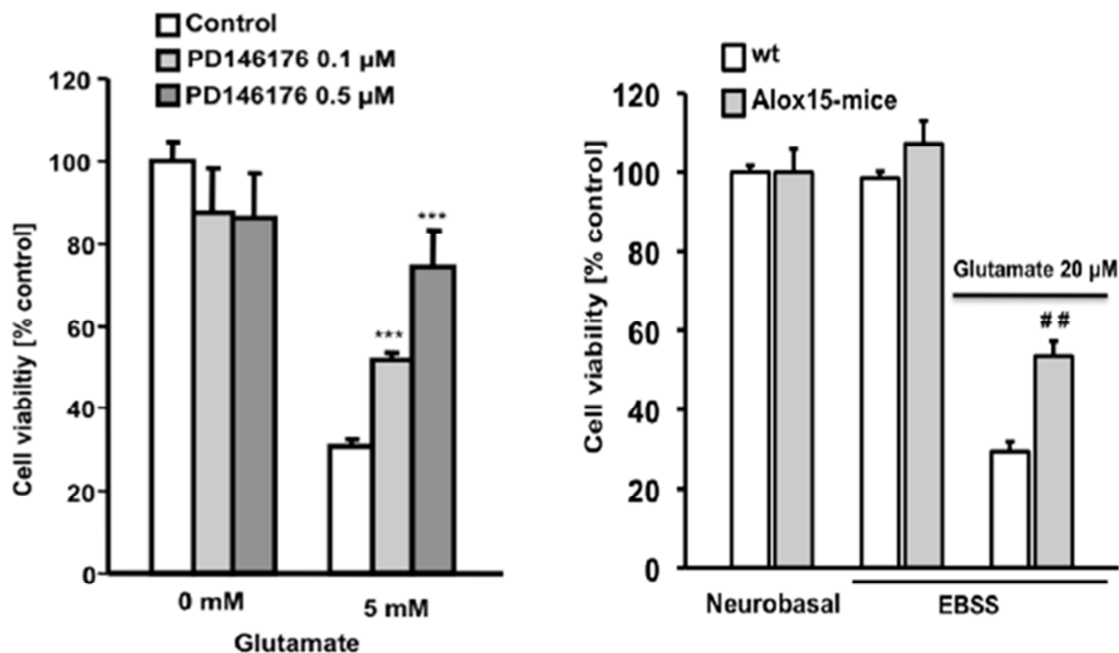


Abbildung 11 Links: Anteil der überlebenden HT-22-Zellen (cell viability) in Relation zur Kontrollgruppe. Der LOX-12/15- Inhibitor PD146176 wurde hierbei 1 Stunde vor Glutamatgabe appliziert. Die LOX- Inhibition führte zu einem signifikant größeren Anteil an überlebenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. **Rechts:** Anteil der überlebenden primären Neurone in Relation zur Kontrollgruppe. Die Neurone wurden aus Alox-15-Knock-Out-Mäusen gewonnen (d.h. die Zellen exprimieren natürlicherweise keine LOX-15). Nach Glutamat-bedingtem Zellschaden zeigt sich eine signifikante Verbesserung des Zellüberlebens. wt = Wildtyp; EBSS = Bezeichnung für Nährlösung der in-vitro Zellzüchtung. Abbildungen mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach²⁰⁰

Auch wenn HT-22-Zellen keine ionotropen Rezeptoren ausbilden²⁰¹, zeigten sich nach Glutamatexposition in diesen Zellen die Bildung von ROS und die Entwicklung von oxidativem Stress, was wie bei primären Neuronen auf eine Störung in der Calciumhomöostase zurückgeführt werden konnte. In primären Neuronen führte eine LOX-12/15-Inhibition zu einer signifikanten Reduktion des glutamatbedingten Calciumeinstroms und des intrazellulären Calciumspiegels, was eine Beteiligung der Lipoxygenase-12/15 an der Regulation der Calciumhomöostase nahelegt (siehe Abb. 12).

Intrazellulär konnte des Weiteren ein deutlicher Anstieg an Lipidperoxiden nachgewiesen werden. So zeigte sich ein erster Anstieg ca. 6-8 Stunden nach Glutamatexposition, der nach ca. 16-18 Stunden deutlich stärker ausgeprägt war (siehe Abb. 12). Dieser Anstieg konnten durch eine Inhibierung der LOX-12/15 signifikant gemindert werden, was eine deutliche Reduktion der ROS zur Folge hatte. Im Gegensatz dazu konnte eine LOX-12/15-Inhibition bei direkter Applikation von radikalen Sauerstoffspezies den neuronalen Zelltod nicht verhindern²⁰⁰.

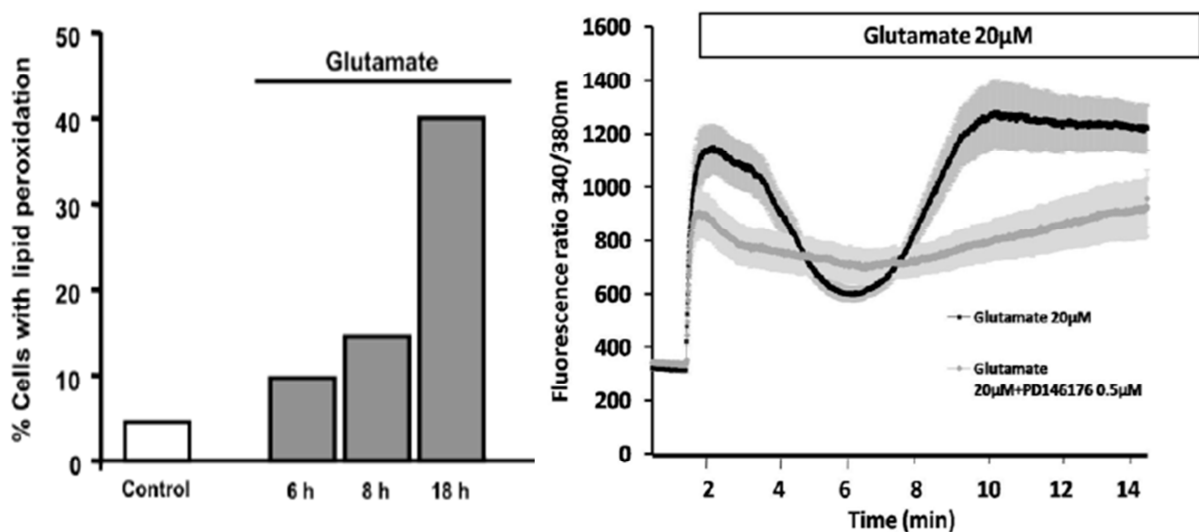


Abbildung 12 Links: Anstieg der Lipidperoxidation nach Glutamatexposition. Ein erster Anstieg zeigt sich nach 6-8h, nach 18h ist dieser Anstieg deutlich stärker ausgeprägt. **Rechts:** Fluoreszenzmessungen mit markierten Calcium-Ionen zeigen die Zunahme von intrazellulärem Calcium nach Glutamatexposition (schwarze Kurve). Lipoxygenasehemmung führt zu einem geringeren Anstieg und zu einem homogenen Calcium-Spiegels im Beobachtungszeitraum (graue Kurve). Abbildungen mit freundlicher Genehmigung modifiziert nach²⁰⁰

Auch in Bezug auf die Degeneration der Mitochondrien zeigte sich eine Schlüsselrolle der Lipoxygenase-12/15. So führte eine LOX-12/15-Inhibierung zu einer signifikanten Reduzierung von degenerierten Mitochondrien. Damit zusammenhängend wurde der durch oxidativen Stress und Exzitotoxizität bedingte ATP-Verlust durch die LOX-12/15-Inhibition nahezu komplett verhindert²⁰⁰.

Zusammenfassend ließ sich also sowohl bei HT-22-Zellen als auch bei primären Neuronen eine positive Wirkung der LOX-12/15-Inhibition nach Glutamat-induziertem oxidativen Stress zeigen, was auf eine Regulation der Calciumhomöostase, einer verminderten Lipidperoxidation und eine protektive Wirkung auf die Mitochondrien zurückgeführt wurde. Im Gegensatz dazu hatte die Inhibition der LOX-5, ebenso wie die Inhibition der Cyclooxygenasen keine protektive Wirkung auf die Zellen²⁰⁰.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Nach Schädel-Hirn-Trauma trägt die Entwicklung des sekundären Hirnschadens maßgeblich zum Gesamt-Outcome bei. Die pathophysiologischen Vorgänge der posttraumatischen Hirnschädigung sind vielschichtig und bisher nicht vollständig geklärt. Ebenso fehlt bisher eine kausale Therapiemöglichkeit zur Verringerung des sekundären Hirnschadens nach SHT.

Ein Bestandteil der Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach SHT ist die Zellschädigung durch reaktive Sauerstoffspezies nach oxidativem Stress. Eine Hemmung von Lipoxygenasen ist in dieser Hinsicht aufgrund ihrer Beteiligung an der Oxidation von Lipiden ein mögliches Therapiekonzept.

Die im vorherigen Abschnitt dargestellten Ergebnisse konnten eine neuroprotektive Wirkung einer 12/15-LOX-Inhibition zeigen. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen war die Fragestellung dieser Arbeit, ob Lipoxygenasen auch in der Entstehung des posttraumatischen Hirnschadens eine Rolle spielen und ob durch eine pharmakologische Inhibition auch in-vivo eine Neuroprotektion erzielt werden kann. Hierbei sollten verschiedene Parameter des strukturellen Hirnschadens sowie physiologische Parameter untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche verwendeten wir männliche C57bl/6- Mäuse mit einem Gewicht von 19-22g und einem Alter von 6-8 Wochen (Charles River, Kisslegg). Die Tiere erhielten freien Zugang zu Nahrung und Wasser und wurden bei einem 12h-Helligkeit-12h-Dunkelheit-Zyklus gehalten.

Alle beschriebenen Prozeduren sind im Einklang mit den Richtlinien der Regierung von Oberbayern über die Durchführung von Tierversuchen (Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-118-05) durchgeführt worden. Die Konzipierung der Studie erfolgte nach den Leitlinien des National Centre for the Replacement & Reduction of Animals in Research (NC3Rs), der sogenannten ARRIVE-Guideline²⁰².

2.2 Narkose

Die Narkoseeinleitung erfolgte in einer abgeschlossenen Beatmungskammer mit 4% Isofluran (Aesica Queenborough Limited, Queenborough, Kent, Vereinigtes Königreich; Vernebler: Forene Vapor 19.3, Dräger, Lübeck), bis die Standreflexe erloschen waren. Unmittelbar hierauf erfolgte das Einspannen in eine stereotaktische Halterung mittels Nasenklemme und Gaumenplatte (Kopf Instruments, Tujunga, CA, USA). Zur Aufrechterhaltung der Narkose beatmeten wir die Tiere anschließend über eine Gesichtsmaske mit einem Gemisch aus 1,2 % Isofluran, 30 % Sauerstoff und 69 % Lachgas.

Die Körpertemperatur der Versuchstiere wurde mithilfe einer Heizplatte, welche über eine rektale Sonde rückgekoppelt war, bei konstant 37°C gehalten (FHC, Bowdoinham, ME, USA).

Postoperativ wurden die Tiere mit Metamizol (200mg/kg KG) analgetisch versorgt.

2.3 Chirurgische Präparation und Traumainduktion

Für die Induktion eines standardisierten und reproduzierbaren Schädel-Hirn-Traumas wurde das Controlled-Cortical-Impact-Modell (CCI) verwendet. Hierbei wird mit einem durch Pressluft betriebenen Stempel eine reproduzierbare Kontusion erreicht. Die Eindringtiefe wird hierfür mittels einer Mikrometerschraube genau eingestellt. Mithilfe eines Sensors im Gerät können zudem die Kontaktzeit und die Geschwindigkeit des Bolzens bestimmt und reguliert werden.

Die Tiere wurden in eine stereotaktische Halterung eingespannt und es wurde ein paramedianer Hautschnitt angelegt und die Galea im Kraniotomieareal entfernt. Mithilfe eines Präzisionsbohrers (Rewatronic Products, Wald-Michelbach; Bohrkopf GD890R, Durchmesser 0,6mm, Aesculap, Tuttlingen) wurde eine rechts parietale Kraniotomie ohne Verletzung der Dura Mater durchgeführt. Zur Vermeidung von Hitzeschäden erfolgte eine kontinuierliche Spülung mit 0,9%-iger Kochsalzlösung. Paramedian wurde der Schädelknochen intakt belassen, so dass die Knochenplatte entlang der mittleren Schädelnaht nach medial aufgeklappt werden konnte.

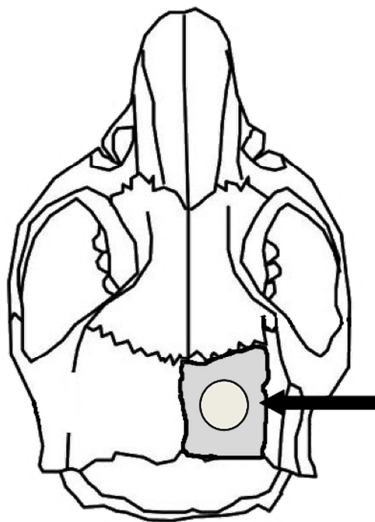


Abbildung 13 Schematische Darstellung der Stempellokalisierung für die Traumaapplikation (hellgrauer Kreis). Der dunkelgrau markierte Knochenabschnitt des Os parietale wurde zuvor durch anteriore, laterale und dorsale Kraniotomie losgelöst und nach medial aufgeklappt.

Das Tier wurde anschließend unter dem CCI-Gerät in Position gebracht, wobei auf eine senkrechte Stellung des Bolzens auf der Dura mater geachtet wurde. Mit einer Eindringtiefe von 1 mm, einer Geschwindigkeit von 8 m/s und einer Kontaktzeit von 150 ms erfolgte nun die Traumainduktion.

Unmittelbar danach wurde die Kraniotomie durch Repositionierung des zuvor hochgeklappten Knochenstückes verschlossen, mit Fibrinkleber (VetBond 3TM) versiegelt und der Hautschnitt in Einzelknopftechnik (Etibond excel 5-0) verschlossen. Die Narkose wurde beendet und die Tiere zurück in ihre Käfige verbracht. Um eine Hypothermie zu vermeiden, wurden die Tiere für 60 Minuten nach Trauma bei 34°C und 40% Luftfeuchtigkeit gehalten.

2.4 Medikamente und Chemikalien

2.4.1 Pharmakologische Hemmung der 12/15-LOX

Zur pharmakologischen Hemmung der LOX-12/15 verwendeten wir 6,11-Dihydro-[1]benzothiopyrano[4,3-b]indol (PD146176, Sigma Aldrich, München), aufgelöst in 98% physiologischer, phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS, engl. für phosphate buffered saline, Sigma Aldrich, München) mit 2% DMSO (=Dimethylsulfoxid, Sigma Aldrich, München). PD146176 ist ein hochselektiver Inhibitor der Lipoxygenase 15. Es wurde bereits in mehreren in-vivo Studien verwendet^{203,204}. Auch in der in-vitro Studie unserer Kollaborationspartner aus Marburg wurde PD146176 zur Hemmung der LOX-12/15 verwendet²⁰⁰. Zur Herstellung der Dosierungen wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 40mg/ml hergestellt und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Durchführung der Versuche erfolgte die Herstellung der einzelnen Dosierungen durch Verdünnung der Stammlösung mit der PBS-DMSO-Lösung. Die Tiere erhielten 0,4, 4, 6 oder 8 mg Wirkstoff pro kg Körpergewicht intraperitoneal. Das applizierte Volumen schwankte je nach Körpergewicht zwischen 20 und 25µl.

2.4.2 Pharmakologische Hemmung der 5-LOX

Als LOX-5 Inhibitor wurde 2-[[4-chloro-6-[(2,3-dimethylphenyl)amino]-2-pyrimidinyl]thio]-oktansäure (Biomol GmbH, Hamburg) verwendet. YS121 ist ein künstliches Derivat der Pirinixic-Säure und entsteht durch eine artifizielle Veresterung²⁰⁵. Während die pirinixidische Säure selbst keine inhibitorische Wirkung besitzt, haben einige ihrer Ester-Derivate eine hemmende Wirkung auf die Lipoxxygenase-5 und die mikrosomale Prostaglandin-E2-Synthase (mPEG), wobei mit der Größe der Ester die Hemmung der Lipoxxygenase zu und die Hemmung der mPEG abzunehmen scheint^{206,207}. Zunächst wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von 60 mg/ml YS121 in 96% PBS und 4% DMSO hergestellt und bei -20°C gelagert. Unmittelbar vor Durchführung der Versuche erfolgte die Herstellung der einzelnen Dosierungen durch Verdünnung der Stammlösung. Die Tiere erhielten 0,3 oder 0,6 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal. Das applizierte Volumen schwankte je nach Körpergewicht zwischen 20 und 25 µl.

2.5 Bestimmung des Nekrosevolumens

2.5.1 Herstellung der Präparate

24 Stunden nach der Traumainduktion erfolgte die Tötung der Tiere durch cervikale Dislokation in tiefer Isoflurannarkose. Unmittelbar danach wurden die Hirne sorgfältig entnommen, in pulverisiertem Trockeneis gefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Bestimmung des Nekrosevolumens erfolgte an coronaren Kryoschnitten. Hierzu wurden die Gehirne eingebettet (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL) und mithilfe eines Kryostaten (Cryostar MH 560, Microm, Walldorf) 10µm dicke Schnitte in Abständen von 500µm angefertigt. Der erste Schnitt erfolgte hierbei 1000µm distal des Bulbus oculi. Die Schnitte wurden auf einem Objektträger aufgesogen (SuperFrost®, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim) und nach Nissl mit Kresyl-Violett gefärbt (siehe nachfolgendes Färbeprotokoll). Pro Tier wurden 14 Schnittebenen untersucht.

Verwendetes Färbeprotokoll:

1. Fixierung der Schnitte mit 70% Ethanol für 2 Minuten
2. Färbung mit Kresylechtviolett für 10 Minuten
3. Spülen durch dreimaliges Eintauchen in destilliertes Wasser
4. je zweimaliges Eintauchen in aufsteigende Alkoholreihe (70%, 96% 100%)
5. 2 Minuten Eintauchen in Isopropanol
6. zweimaliges Xylolbad(je 5 Minuten)
7. Eindeckeln mit Eukitt (O. Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland)

2.5.2 Histomorphometrische Bestimmung des Läsionsvolumens

Mit Hilfe eines Mikroskops (Olympus BX 41, Olympus, Hamburg) und einer daran angeschlossenen Kamera (Olympus Camedia C5050, Olympus, Hamburg) wurden digitale Aufnahmen in 12,5-facher Vergrößerung angefertigt. Die Läsionsfläche wurde durch manuelle Markierung mithilfe einer Auswertungssoftware (Olympus DP-Soft, analySIS, Version 3.2., Olympus, Hamburg) ermittelt (siehe Abb. 14). Die Berechnung des Läsionsvolumens erfolgte durch Aufsummierung der einzelnen Läsionsflächen nach der Formel $A_1 \times 0,5 + A_2 \times 0,5 + \dots + A_{14} \times 0,5$.



Abbildung 14 Beispiel eines nach Nissl gefärbten Hirnschnitts mit eingezeichneter Markierung der Läsionsfläche.

2.6 Bestimmung des Hirnwassergehaltes

Zur Quantifizierung des Hirnödems bestimmten wir den Hirnwassergehalt mittels der Feucht-Trockenmethode.

Hierzu wurden 24 h nach Trauma die Hirne entnommen. Anschließend wurde mithilfe einer gekühlten koronaren Metall-Hirn-Matrix (WPI, Berlin) das Kleinhirn und die Bulbus olfactorii entfernt und die Hemisphären an der Mittellinie getrennt. Die Hemisphären wurden gewogen (Wäageglas 35 x 30 mm, Schott AG, Jena), um deren Feuchtgewicht (FG) zu bestimmen. Zur Bestimmung des Trockengewichtes (TG) lagerten die Hirne 24 Stunden bei 100°C in einem Trockenschrank (Memmert, Schwabach) und wurden danach erneut gewogen. Der Hirnwassergehalt ergibt sich nun aus der Differenz der beiden erhobenen Werte und wird in Prozent vom Ausgangsgewicht angegeben: $\text{Hirnwassergehalt (in \%)} = (\text{FG} - \text{TG} / \text{FG}) * 100$.

2.7 Bestimmung des Neuroscores

Zur Untersuchung der neurologischen Funktion wurden die Tiere jeweils unmittelbar vor und 24h nach Trauma mithilfe einer neurologischen Testbatterie, dem sogenannten Neurological Severity Score (=NSS)²⁰⁸, neurologisch getestet.

Hierzu wurden die Tiere zunächst in der Mitte eines Reifens (Höhe ca. 1 cm) mit einem Durchmesser von einem Meter positioniert. Das Verhalten der Tiere wurde beobachtet und hinsichtlich des Gangbildes und des Suchverhaltens beurteilt. Zudem induzierten wir eine Schreckreaktion (startle reaction). Im Anschluss daran wurde die Fähigkeit der Tiere beurteilt, über quadratische Holzstäbe mit 3,2 und 1 cm Kantenlänge zu laufen (beam walk). Zum Abschluss werteten wir, wie gut sich die Tiere an einem rotierenden quadratischen bzw. runden Stab festhalten konnten (grip test). Dies wurde einmal ohne Bewegung getestet und anschließend wurde der Stab umgedreht und bewegt, bis die Tiere mindestens mit einer Pfote den Halt verloren. Während der gesamten Beobachtungszeit suchten wir Hinweise auf eventuell vorhandene Paresen, das Vorhandensein einer Hemiparese wurde separat gewertet.

Die verschiedenen Tests wurden jeweils mit 0 bis 2 Punkten bewertet, wobei null das beste und 20 Punkte das schlechteste Ergebnis darstellt (siehe Tabelle 2).

Verlassen eines Reifens (Durchmesser = 1 m, Höhe = 1 cm)		
	verlässt Reifen innerhalb von 2 Minuten	0 Punkte
	bleibt auf Begrenzung sitzen	0,5 Punkte
	stellt sich an Begrenzung auf	1 Punkt
	Verlässt Reifen nicht	2 Punkte
Suchverhalten		
	Aktive Suche	0 Punkte
	Sucht verlangsamt, macht Pausen	1 Punkt
	Bleibt sitzen	2 Punkte
Schreckreaktion (startle reaction) auf Händeklatschen		
	Normale Schreckreaktion (Zusammenzucken, Flucht)	0 Punkte
	Verringerte Reaktion (nur leichtes Zucken, Verharren in Position)	1 Punkt
	Keine Bewegung nach Klatschen	2 Punkte
Laufen		
	Läuft gerade	0 Punkte
	Weicht zu einer Seite ab	1 Punkt
	Keine Bewegung	2 Punkte
Hemiparese		
	Keine Hemiparese	0 Punkte
	Leichtes Hinken der linken Hinterpfote	1 Punkt
	Hemiparese links	2 Punkte
Balancieren auf Balken mit quadratischem Querschnitt (Länge 1 m; Breite 2,5/1,9/0,9 cm)		
	Fehlerfreier Lauf über Balken	je 0 Punkte
	Regelmäßiges Abrutschen, Kauern	je 1 Punkt
	Herunterfallen vom Balken	je 2 Punkte
Greiffunktion (Stab eckig 0,5 x 0,5 cm; Stab rund d = 0,5 mm)		
	Halten mit allen 4 Pfoten trotz Schütteln	je 0 Punkte
	Halten mit 3 Pfoten nach Schütteln	je 0,5 Punkte
	Herunterfallen durch Schütteln	je 1 Punkt
	Halten nicht möglich	je 2 Punkte

Tabelle 4 Beurteilungskriterien des Neurological Severity Score (NSS) zur Beurteilung des neurologischen Outcomes nach Schädel-Hirn-Trauma

2.8 Experimentelle Gruppen

In einer ersten Studie untersuchten wir die Auswirkung der LOX-12/15-Inhibition auf das Nekrosevolumen 24h nach CCI. Hierzu erhielten die Tiere (Gruppengröße n=10) jeweils verblindet und randomisiert entweder eine intraperitoneale Injektion des spezifischen LOX-12/15-Inhibitors PD146176 in den Dosierungen 0,4 mg/kg, 4 mg/kg, 6 mg/kg bzw. 8 mg/kg oder zur Kontrolle eine intraperitoneale Injektion der Trägersubstanz (98% PBS/ 2% DMSO).

Die Bestimmung des Hirnwassergehaltes und die Erhebung des Neuroscores erfolgten in einer weiteren Versuchsreihe. In dieser wurde den Tieren wiederum verblindet und randomisiert intraperitoneal der spezifische LOX-12/15-Inhibitor PD146176 in den Dosierungen 0,4 mg/kg bzw. 4 mg/kg injiziert (Gruppengröße n=7). Wie in der ersten Studie erhielt die Kontrollgruppe eine Injektion mit 2%-DMSO.

Die Wirkung der LOX-5-Inhibition auf das Nekrosevolumen untersuchten wir analog zu den LOX-12/15-Versuchsreihen durch eine verblindete und randomisierte intraperitoneale Injektion des spezifischen LOX-5-Inhibitors YS121 in den Dosierungen 0,3 mg/kg oder 0,6 mg/kg bzw. einer Kontrollinjektion von 4%- DMSO (Gruppengröße jeweils n=10).

Die Zuordnung der Tiere zu den Versuchsgruppen wurde für jedes Einzeltier per Los bestimmt. Diese Randomisierung und die unmittelbar darauf folgende Injektion der Inhibitoren erfolgten verblindet. Während des gesamten Versuchsablaufes und der gesamten Auswertung war der Untersucher hinsichtlich der injizierten Substanzen und Dosierungen und damit hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit der Tiere verblindet. Die Entblindung und Zuordnung zu den Versuchsgruppen erfolgte erst nach der vollständigen Erhebung und Auswertung der einzelnen Zielparameter.

2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SigmaPlot (Systat Software, Inc. ©2011). Mit einem angestrebten Signifikanzniveau von 0,05 und einem angestrebten Fehler 2. Art von 0,2 ergab sich bei einer angenommenen biologisch relevanten Differenz von 30% und einer mutmaßlichen Standardabweichung von 15% im Hinblick auf das

Nekrosevolumen und das Hirnödem eine errechnete Gruppengröße von mindestens 8 Tieren. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde von einer nicht-normalverteilten Untersuchungspopulation ausgegangen. Als statistische Methode verwendeten wir daher eine Varianzanalyse (Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks) für die Gesamtdaten. Vergleiche zwischen den Gruppen erfolgten durch einem Wilcoxon-Rangsummentest (rank sum test). Zur besseren Übersichtlichkeit werden die Werte dennoch als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD, für engl. standard deviation) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der Standardisierungsreihe

Um zu überprüfen, ob das Controlled-Cortical-Impact-Modell beherrscht wurde, wurde eine Standardisierungsreihe durchgeführt. Zur Bestimmung des primären Hirnschadens erfolgte die Hirnentnahme bei einer Versuchsgruppe nach 15 Minuten (n=11), die Evaluation des sekundären Hirnschadens erfolgte bei einer zweiten Versuchsgruppe durch Hirnentnahme nach 24 Stunden (n=10).

Das Läsionsvolumen 15 Minuten nach CCI betrug im Mittel $8,3 \text{ mm}^3 \pm 3,6 \text{ mm}^3$, das Läsionsvolumen 24 Stunden nach Trauma im Mittel $31,5 \text{ mm}^3 \pm 4,3 \text{ mm}^3$.

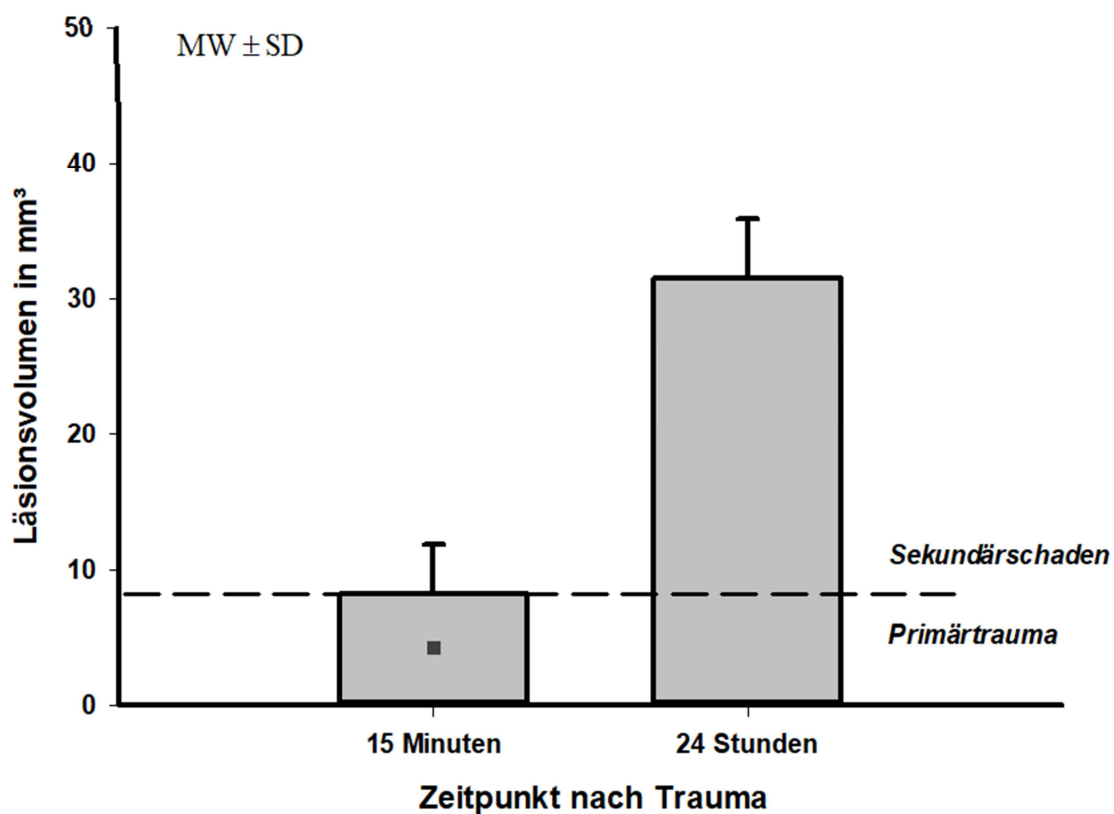


Abbildung 15 Ergebnisse der Standardisierungsreihe. Nekrosevolumen 15 Minuten und 24 Stunden nach Controlled-Cortical-Impact, dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung.

3.2 Einfluss der LOX-12/15-Inhibition auf das Nekrosevolumen nach experimentellem SHT

Um den Einfluss der Lipoxigenase-Inhibition auf das Nekrosevolumen zu bestimmen, wurden 10 Minuten vor der Traumainduktion verblindet verschiedene Konzentrationen des LOX-Inhibitors PD146176 intraperitoneal injiziert. 24 Stunden nach CCI wurden wie oben beschrieben die Hirne entnommen und mikroskopisch untersucht. Die Gruppengröße der Kontrollgruppe betrug 21 Tiere, da die Versuche in zwei Etappen durchgeführt wurden (zunächst der Vergleich der Gruppen mit den Dosierungen 0,4 mg/kg Körpergewicht (=KG), 4 mg/kg KG und einer Kontrollgruppe von 10 Tieren, anschließend eine Versuchsreihe mit den Dosierungen 6 mg/kg KG, 8 mg/kg KG und einer weiteren Kontrollgruppe von 11 Tieren). Alle anderen Versuchsgruppen schlossen zehn Tiere ein. Alle Tiere überlebten bis zum geplanten Versuchsende (24 Stunden nach CCI)

Die Kontrollgruppe zeigte 24 Stunden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma ein mittleres Nekrosevolumen von $23,5 \text{ mm}^3 \pm 2,7 \text{ mm}^3$. Die Gruppe, die PD146176 in einer Dosierung von 0,4 mg/kg KG erhalten hatte, wies ein signifikant geringeres Nekrosevolumen auf mit einem mittleren Läsionsvolumen von $20,8 \text{ mm}^3 \pm 4,3 \text{ mm}^3$ ($p=0,039$). Nach Gabe von höherem Dosen des LOX-Inhibitors zeigten sich weiterhin geringere Läsionsvolumina als in der Kontrollgruppe, ohne dass die Ergebnisse jedoch das angestrebte Signifikanzniveau erreichten. Hierbei ergab sich für die Versuchsgruppe mit der Dosierung von 4 mg/kg KG ein durchschnittliches Nekrosevolumen von $21,0 \text{ mm}^3 \pm 4,5 \text{ mm}^3$, wobei das Signifikanzniveau beim statistischen Test mit den Mittelwerten jedoch knapp nicht erreicht wird ($p=0,058$). Auch die Versuchsgruppen mit einer Dosierung von 6 mg/kg KG ($22,8 \text{ mm}^3 \pm 2,7 \text{ mm}^3$) und einer Dosierung von 8 mg/kg KG ($23,5 \text{ mm}^3 \pm 2,7 \text{ mm}^3$) wiesen noch ein gering reduziertes Nekrosevolumen im Vergleich zur Kontrolle auf.

Gruppe	N	Mittelwert	Std.Abw.	Std.Feh.	Median
Kontrolle	21	23,5	2,6	0,6	23,2
0,4 mg/kg	10	20,8	4,3	1,4	21,4
4 mg/kg	10	21,0	4,6	1,4	20,6
6 mg/kg	10	22,8	2,7	0,9	22,2
8 mg/kg	10	23,5	2,7	0,9	24,5

Tabelle 5 Deskriptive Statistikwerte der Versuchsreihe mit LOX12/15- Inhibitoren. Darstellung der Gruppengröße, des Mittelwertes, der Standardabweichung (Std.Abw.), des Standardfehlers (Std.Feh.) und des Medians

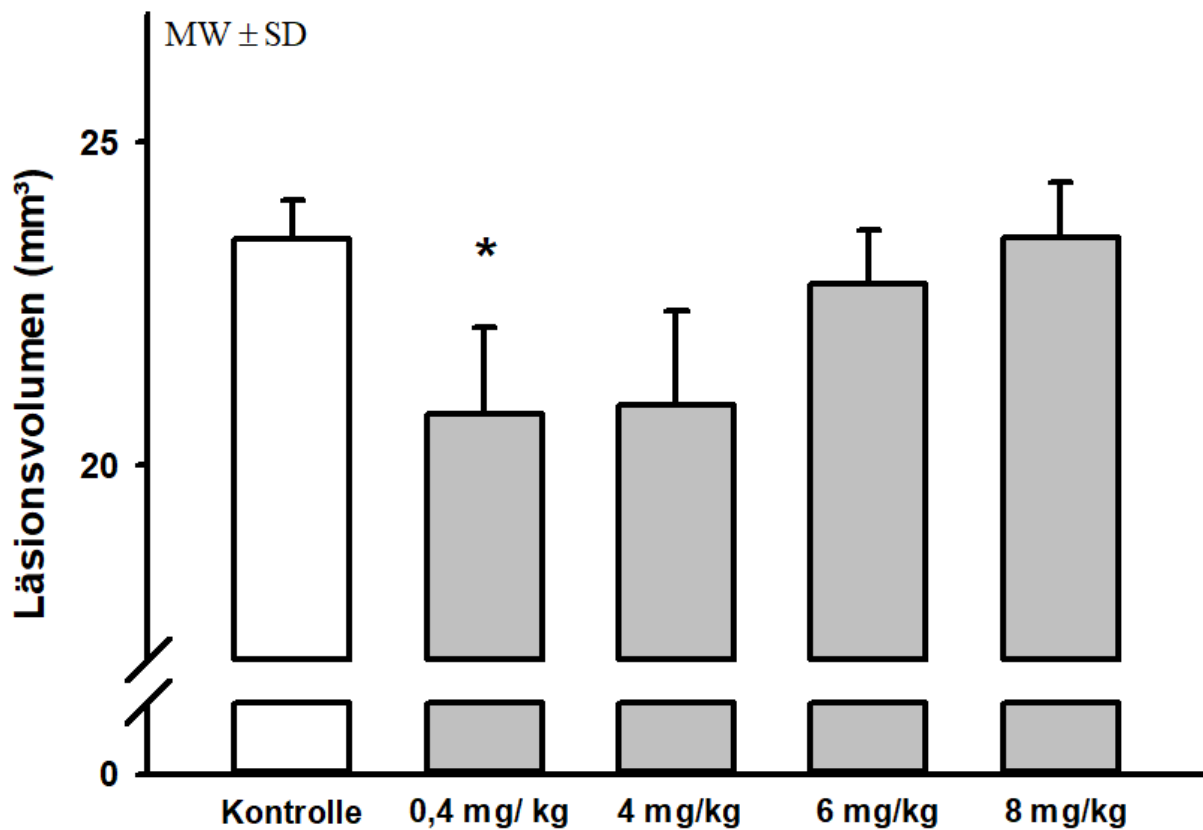


Abbildung 16 Nekrosevolumen 24 Stunden nach Controlled-Cortical-Impact, dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler. Das Nekrosevolumen in der Versuchsgruppe, die den LOX12/15-Inhibitor in einer Dosierung von 0,4 mg/kg KG erhalten hatte, war signifikant geringer als in der Kontrollgruppe ($p=0,039$).

3.3 Einfluss der LOX-5 Inhibition auf das Nekrosevolumen nach experimentellem SHT

Die Anwendung des 5-LOX-Inhibitors 10 Minuten vor CCI zeigte in den Dosierungen 0,3 mg/kg und 0,6 mg/kg keinen Einfluss das Nekrosevolumen 24 Stunden nach Traumainduktion. In der Kontrollgruppe ergab sich ein mittleres Nekrosevolumen von $27,1 \pm 4,5 \text{ mm}^3$. In den Therapiegruppen zeigte sich bei der Dosierung mit 0,3 mg/kg KG ein durchschnittliches Nekrosevolumen von $27,21 \pm 4,5 \text{ mm}^3$ und bei einer Dosierung von 0,6 mg/kg KG ein Mittelwert von $27,40 \pm 4,4 \text{ mm}^3$. Kein Tier verstarb vor Ende des Versuchs.

<u>Gruppe</u>	<u>N</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Std.Abw.</u>	<u>Std.Feh.</u>	<u>Median</u>
Kontrolle	8	27,1	4,5	1,6	26,3
0,3 mg/kg	8	27,2	4,5	1,6	26,8
0,6 mg/kg	8	27,4	4,4	1,6	27,2

Tabelle 6 Deskriptive Statistikwerte der Versuchsreihe mit LOX5- Inhibitoren. Darstellung der Gruppengröße, des Mittelwertes, der Standardabweichung (Std.Abw.), des Standardfehlers (Std.Feh.) und des Medians

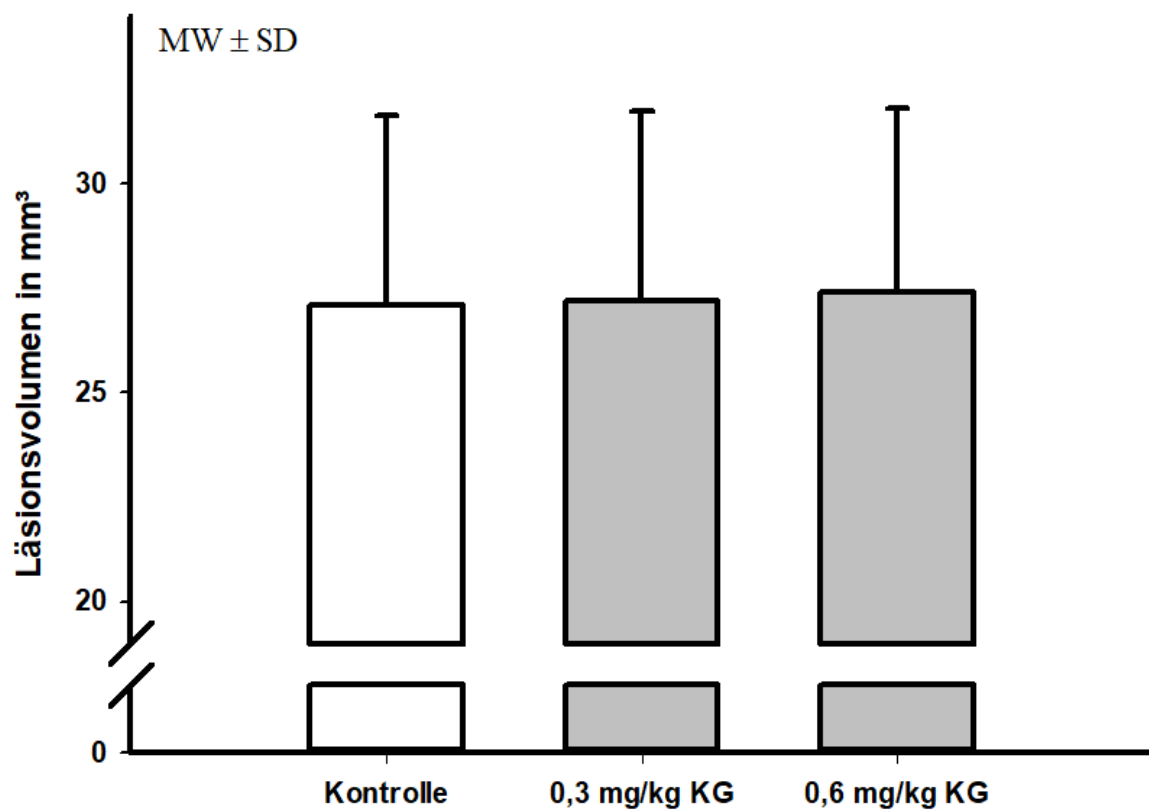


Abbildung 17 Nekrosevolumen 24 Stunden nach Controlled-Cortical-Impact, dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Nach Hemmung der Lipxygenase-5 mittels YS121 in den Dosierungen 0,3 mg/kg KG und 0,6 mg/kg KG zeigen sich keine signifikanten Unterschiede der Läsionsvolumina.

3.4 Einfluss der LOX-12/15-Inhibition auf das posttraumatische Hirnödem nach experimentellem SHT

Der Hirnwassergehalt der traumatisierten und der kontralateralen, nicht-traumatisierten Hemisphäre betrugen $81,8\% \pm 1,5\%$ bzw. $82,0\% \pm 1,0\%$ und waren damit um ca. 3% gegenüber dem Normwert von 79% erhöht.

In unserer Studie lässt sich kein Effekt der Lipoxygenase-12/15-Inhibition auf die ödematöse Gewebeswellung der vom Trauma betroffenen Hemisphäre nachweisen. Eine diskrete Minderung des Hirnwassergehaltes zeigt sich allerdings in der kontralateralen Hemisphäre, d.h. der nicht unmittelbar vom Primärtrauma betroffenen Seite. Hier sinkt der Hirnwassergehalt unter Medikation mit PD146176 auf $80,5\% \pm 1,2\%$ bei einer Dosierung von 0,4 mg/kg KG und auf $80,8\% \pm 1,3\%$ bei einer Dosierung von 4 mg/kg KG. Dieser Effekt erreicht jedoch nicht das statistische Signifikanzniveau ($p = 0,07$).

Gruppe	N	Mittelwert	Std.Abw.	Std.Feh.	Median
Kontrolle Trauma	7	81,8	1,5	0,6	81,7
Kontrolle kontralateral	7	82,0	1,1	0,4	81,8
0,4 mg/kg Trauma	7	81,7	1,7	0,6	82,1
0,4 mg/kg kontralateral	7	80,5	1,2	0,5	80,5
4 mg/kg Trauma	7	82,0	1,1	0,4	81,8
4 mg/kg kontralateral	7	80,8	1,3	0,5	80,6

Tabelle 7 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse: Bestimmung des Hirnwassergehaltes (in Prozent des Gesamtgewichtes nach Lipoxygenase-12/15-Hemmung. Darstellung der Gruppengröße, des Mittelwertes, der Standardabweichung (Std.Abw.), des Standardfehlers (Std.Feh.) und des Medians

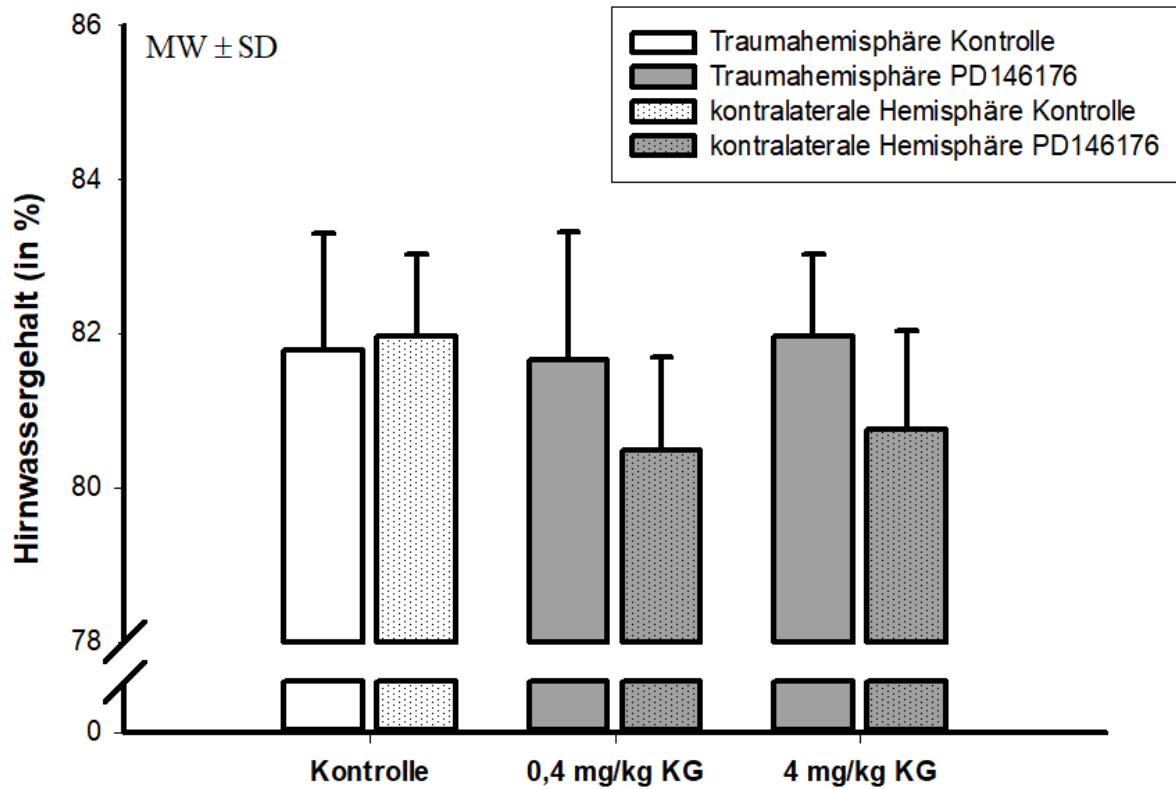


Abbildung 18 Hirnwassergehalt 24 Stunden nach Controlled-Cortical-Impact, dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung. Das posttraumatische Ödem der kontralateralen, nicht traumatisierten Hemisphäre (hellgrau eingefärbt) zeigt nach eine Lipxygenase-Hemmung eine tendenzielle Reduktion ($p=0,07$).

3.5 Einfluss der LOX-12/15 Inhibition auf das neurologische Outcome nach experimentellem SHT

Alle Tiere wurden vor Randomisierung mit dem Neurological Severity Score (=NSS) untersucht. 24 Stunden nach Trauma wurden die Tiere analog der Ausgangstestung im gleichen Versuchsaufbau erneut untersucht. Anschließend wurde für jedes Tier die Differenz aus dem Ergebnis nach Trauma und dem Ergebnis vor Trauma errechnet.

Hierbei zeigt sich in der Kontrollgruppe eine durchschnittliche Verschlechterung des neurologischen Outcomes um $5,1 \pm 2,0$ (Median 5,0) NSS Punkte. Die Gruppe, die den LOX12/15-Inhibitor in einer Dosierung von 0,4 mg/kg KG erhalten hatte, verschlechterte sich durch das Trauma um durchschnittlich $3,4 \pm 0,7$ NSS Punkte (Median 3,0) und zeigte damit ein tendenziell besseres Outcome als die Kontrollgruppe, ohne jedoch ein Signifikanzniveau von 0,05 zu erreichen ($p = 0,054$).

Die Versuchstiere, die eine LOX12/15-Inhibition in einer Dosierung von 4 mg/kg KG erhielten, hatten nach Trauma ein um durchschnittlich $4,6 \pm 1,6$ Punkte schlechteres NSS-Ergebnis und liegen damit im Mittel zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit einer Dosierung von 0,4 mg/kg KG.

<u>Gruppe</u>	<u>N</u>	<u>Mittelwert</u>	<u>Std.Abw.</u>	<u>Std.Feh.</u>	<u>Median</u>
Kontrolle	7	5,1	2,0	0,8	5,0
0,4mg/kg	7	3,4	0,7	0,3	3,0
4mg/kg	7	4,6	1,4	0,5	4,0

Tabelle 8 Deskriptive Statistikwerte der Versuchsreihe zur Bestimmung des Neuroscores bei Lipoxxygenase-12/15-Hemmung. Darstellung der Gruppengröße, des Mittelwertes, der Standardabweichung (Std.Abw.), des Standardfehlers (Std.Feh.) und des Medians

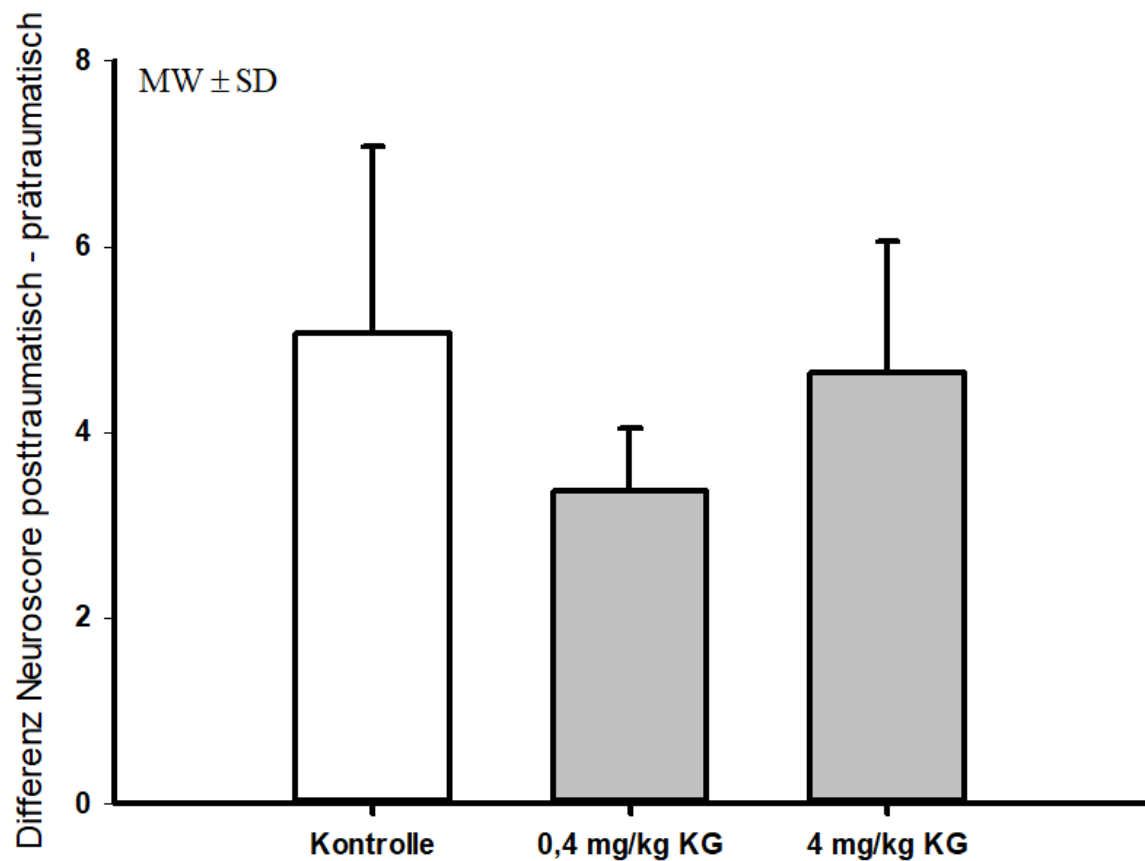


Abbildung 19 Differenz des posttraumatischen Neurological Severity Score (=NSS) zum prätraumatischen NSS. Die Lipoxxygenase-12/15-Hemmung in der Dosierung von 0,4 mg/kg KG bewirkt eine tendenzielle Verbesserung des neurologischen Outcomes ($p=0,07$).

4. Diskussion

4.1. Diskussion der Methoden

4.1.1. Controlled-Cortical-Impact-Mausmodell

Aufgrund der vielfältigen Ursachen und multiplen pathophysiologischen Mechanismen, die beim Schädel- Hirn- Trauma und der nachfolgenden Entstehung des sekundären Hirnschadens eine Rolle spielen, ist es nicht möglich, ein Modell zu erstellen, das alle diese Prozesse komplett abbildet. Vielmehr ist es nötig, unterschiedliche und sich ergänzende Modelle für Teilaspekte der Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas zu nutzen²⁰⁹. Über die letzten Jahrzehnte wurden hierzu mehrere Tiermodelle zur Erforschung der Pathophysiologie des SHTs entwickelt.

Als das am weitesten verbreitete Tiermodell für das fokale Schädelhirntrauma gilt aktuell das Fluid-Percussion-Injury-Modell^{210,211}. Dieses Modell nutzt zur Induktion des Traumas einen schnellen Flüssigkeitsbolus, der auf die intakte Dura auftrifft und sekundär konzentrisch in den Epiduralraum eintritt²¹². Durch Veränderung der Menge des Flüssigkeitsbolus kann die Größe des Primärtraumas beeinflusst werden. Dies wird gesteuert, indem ein Pendel auf ein Flüssigkeitsreservoir fallen gelassen wird, wobei die Fallhöhe und das Gewicht des Pendels die Größe und Schnelligkeit des Flüssigkeitsbolus und somit das Ausmaß der Läsion bedingt. Zudem können unterschiedliche Applikationsorte verwendet werden (z.B. lateral, parasagittal, oder in der Mittellinie), die die Lokalisation des Primärschadens und somit die aus dem SHT resultierenden neurologischen Defizite bestimmen²¹³⁻²¹⁶.

Das von uns verwendete Controlled-Cortical-Impact-Modell wurde erstmals 1988 von Lighthall für das Frettchen beschrieben²¹⁷ und später für kleinere Nager (z.B. Ratten²¹⁸ und Mäuse²¹⁹) weiterentwickelt. Wie beim Fluid-Percussion-Modell wird zur Induktion des Traumas die Schädelkalotte eröffnet, sodass die einwirkende Kraft des Stempels unmittelbar auf die Dura Mater wirkt. Dies ermöglicht eine kontrollierte und reproduzierbare Primärläsion. Nach SHT wird der Schädel wieder verschlossen, um die Entwicklung eines intrakraniellen Druckanstieges zu ermöglichen.

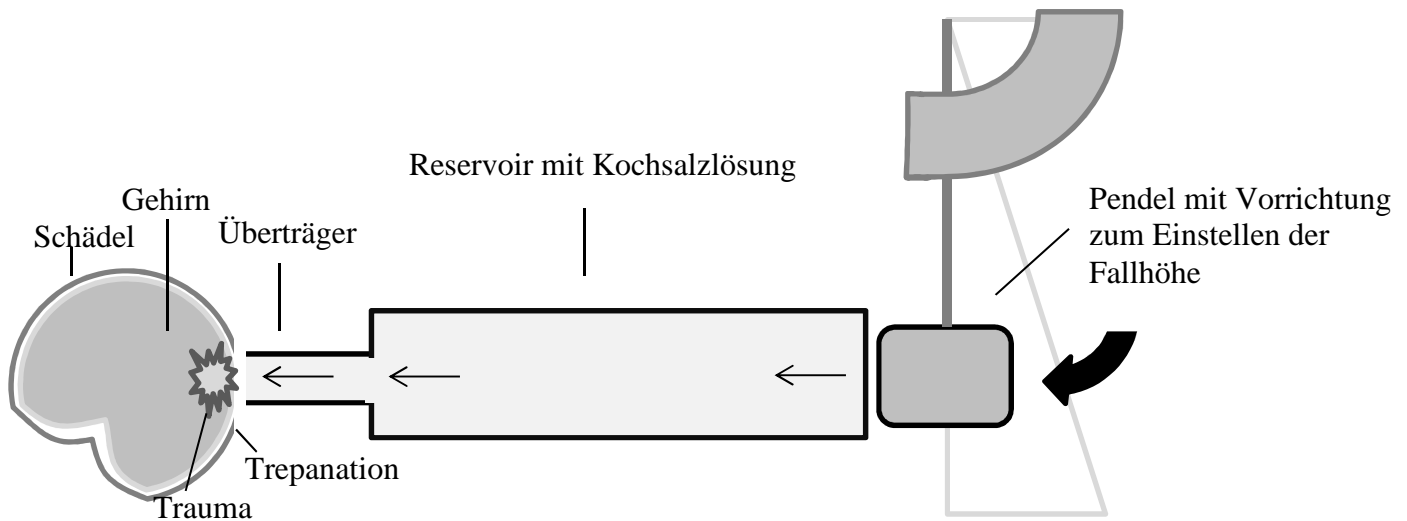
Im Gegensatz dazu besteht bei Modellen, bei denen die Krafteinwirkung auf die geschlossene Schädeldecke erfolgt, eine größere Variabilität in Bezug auf die daraus entstehende

Primärläsion^{220,221}. Ein Beispiel für ein derartiges Modell ist das von Marmarou et al. entwickelte, modifizierte Weight-Drop-Modell^{222,223}, bei dem ein Gewicht aus einer bestimmten Höhe durch ein Führungsrohr auf den Schädel des Versuchstieres fallen gelassen wird. Die Größe des Primärtraumas kann dabei durch das gewählte Gewicht und die gewählte Fallhöhe reguliert werden²²³. Auf dem Schädelknochen wird eine Metallplatte angebracht, um Knochenfrakturen zu verhindern. Des Weiteren wird der Schädel des Versuchstieres nicht fixiert, sondern auf einem Schaumstoffpolster gelagert. Hierdurch werden ein Ausweichen und Zurückfedern des Kopfes und dadurch die Entstehung eines Coup-Contrecoup-Verletzungsmusters ermöglicht, allerdings zum Preis einer höheren Variabilität des Primärtraumas und daher einer geringeren Reproduzierbarkeit²²⁰. Des Weiteren wurden auch Varianten des Weight-Drop-Modells mit direkter Krafteinwirkung auf die Dura beschrieben²²⁴. Der Versuchsablauf beinhaltet hierbei analog zum CCI eine Trepanation, anschließend wird ein Metallstempel auf die Dura fixiert, auf den dann das Gewicht aus einer definierten Höhe fallen gelassen wird. Auch in diesen Varianten wird der Kopf des Versuchstieres nicht fest fixiert, was die Gefahr einer Rebound-Verletzung beim Zurückfedern des Kopfes birgt und daher die Reproduzierbarkeit beeinträchtigen kann²²⁰.

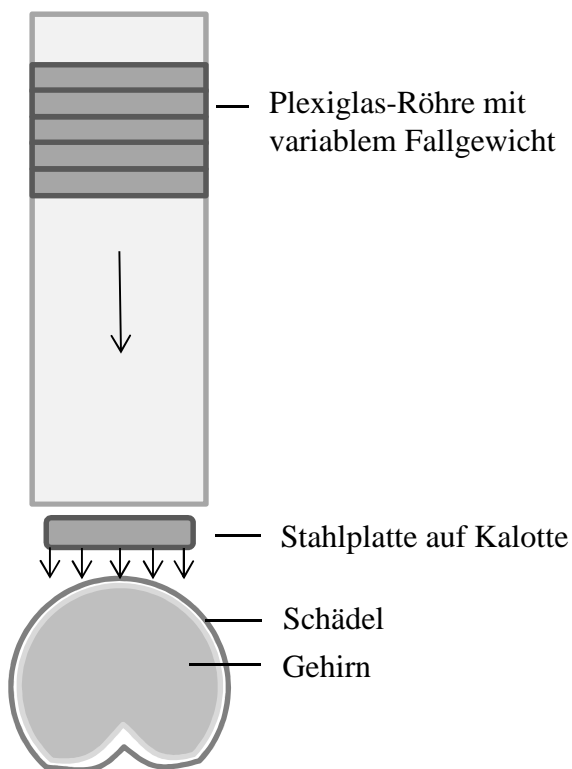
Insgesamt ist die bessere Kontrollierbarkeit des Primärtraumas aufgrund des rigiden Bolzens ein deutlicher Vorteil des von uns verwendeten Controlled-Cortical-Impact-Modells gegenüber dem Fluid-Percussion-Injury-Modell und dem Weight-Drop-Modell²²⁰; so kann neben Geschwindigkeit und Kontaktzeit auch die Eindringtiefe des Bolzens genau reguliert werden²²⁵, während diese Parameter bei den anderen genannten Modellen nur indirekt kontrolliert werden können.

Die zur Durchführung des CCI notwendige Trepanation muss ohne Verletzung der Dura durchgeführt werden, um eine weitergehende und nicht standardisierte Verletzung des Gehirns zu vermeiden. Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass die Trepanation selbst dennoch einen Effekt auf das Traumamodell hat. So zeigte sich zum Beispiel in einer Studie eine verstärkte Degeneration von hippocampalen Neuronen nach Trepanation²²⁶.

A. Fluid-Percussion-Modell



B. Weight-Drop-Modell



C. Controlled-Cortical-Impact-Modell

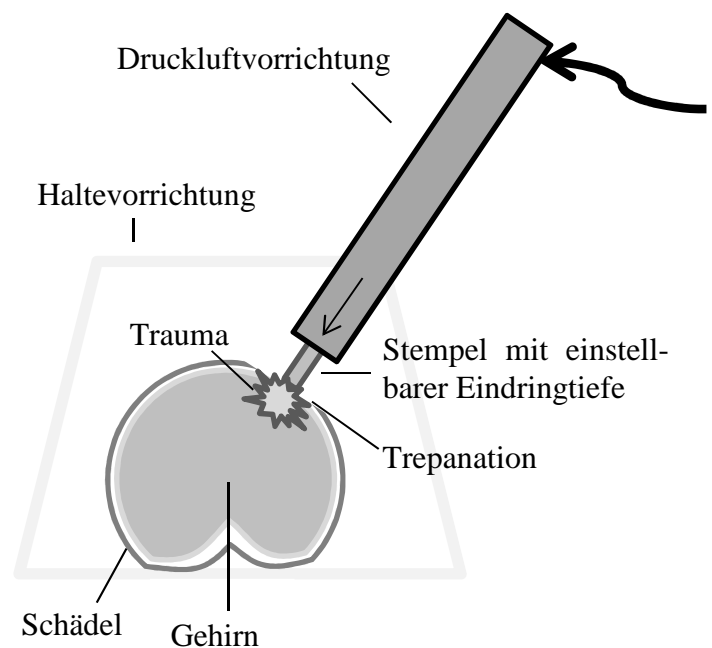


Abbildung 20 Schematischer Vergleich der Versuchsanordnungen bei Fluid-Percussion-Modell, beim Weight-Drop-Modells nach Marmarou und beim Controlled-Cortical-Impact-Modells nach Lighthall (modifiziert nach ²²⁷).

Das Controlled-Cortical-Impact-Modell führt sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus zu einem ausgeprägten kortikalen Schaden und zum Niedergang von grauer und weißer Substanz^{218,219}. Daneben können auch Neuronen im ipsilateralen Hippocampus, Gyrus dentatus oder Thalamus und sogar Strukturen der Gegenseite durch das Trauma zu Grunde gehen, wobei die Größe der betroffenen Areale hierbei unmittelbar durch die Regulation des Traumas geregelt werden kann^{218,219}. Durch diese Verletzungsmuster stellt das Controlled-Cortical-Impact-Modell ein gutes Abbild einer Kontusion des Gehirns dar. Wie bereits beschrieben (Kap. 1.1.4), sind Kontusionen einer der Hauptanteile des primären Hirnschadens.

Die physiologischen Vorgänge nach einem CCI-Trauma modellieren die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens beim Menschen²²⁸. So lassen sich sowohl Entzündungsvorgänge^{229,230} als auch oxidativer Stress^{231,232} und Apoptose^{230,233} nachweisen. Eine ausgedehnte Störung der Blut-Hirn-Schranke tritt beim CCI ebenfalls auf²³⁴.

Auch die funktionellen Defizite, die bei den mit Controlled-Cortical-Impact-Modell traumatisierten Tieren auftreten, bilden einen Großteil der Symptome beim Menschen nach²³⁵. So lassen sich bei den Versuchstieren unter anderem Gedächtnisdefizite²³⁶, Lerneinschränkungen²³⁷ und fokale-neurologische Defizite wie Hemi- oder Monoparesen²³⁸ nachweisen und durch verschiedene neurologische Testverfahren reliabel evaluieren²³⁵.

Das in der aktuellen Studie verwendete CCI Trauma entspricht einem schweren Schädel-Hirn-Trauma beim Menschen; Ziel ist, ohne Mortalität eine ausreichend große Läsion zu erzielen, um durch eine Therapie Unterschiede zeigen zu können. Die von uns gewählten Parameter (8 m/s, 1 mm Eindringtiefe) zeigten in der Standardisierungsreihe ein gut quantifizierbares sekundäres Nekrosevolumen und eine nahezu 100%-ige Überlebensrate. Dies ist auch in Einklang mit Ergebnissen einer vorangegangenen Studie der Arbeitsgruppe²³⁹.

Ein Nachteil des CCI in der verwendeten Stärke ist jedoch das Fehlen eines Hirnstammtraumas. Dies resultiert in gewissen Einschränkungen in Bezug auf die Übertragbarkeit der Ergebnisse von Tierversuchen auf den Menschen, da beim Menschen in bis zur Hälfte der Fälle eine Hirnstambeteiligung beschrieben wird²⁴⁰ und diese mit einer deutlichen Prognoseverschlechterung einhergeht²⁴¹. Um regelhaft eine Hirnstambeteiligung hervorzurufen, wäre jedoch eine hohe CCI-Intensität notwendig, die mit einer stark

gesteigerten Mortalität einhergehen würde. Dies würde eine systematische experimentelle Untersuchung erschweren und wäre auch tierschutzrechtlich bedenklich.

In Anbetracht aller geschilderten Aspekte stellt das Controlled-Cortical-Impact-Modell insgesamt ein hervorragendes Modell einer traumatischen Kontusion dar²²⁵.

4.1.2. Verwendete Medikamente

PD146176

In unserer Studie strebten wir eine hohe Selektivität bei der Inhibition der untersuchten Enzyme an. Zur Inhibition der Lipoxxygenase-12/15 verwendeten wir den Inhibitor PD146176. Sendobry et al. untersuchten die pharmakologischen Mechanismen dieses LOX-Inhibitors und konnten zeigen, dass PD146176 beim Hasen hochselektiv auf die LOX-15 wirkt, während die LOX-5 nicht und die Cyclooxygenasen nur minimal beeinflusst werden²⁴⁹. Bei der Maus als Versuchstier wurde mit diesem Inhibitor bereits eine Vielzahl von Studien durchgeführt, welche eine große Bandbreite von Themen umfassen, so zum Beispiel die Tumorgenese von kolorektalen Karzinomen²⁵⁰, inflammatorische Erkrankungen wie Arthritis²⁵¹ und die Pathophysiologie von neurodegenerativen Erkrankungen²⁰⁴. Nach unserer Kenntnis sind bisher keine gravierenden Nebenwirkungen beschrieben worden. Die in-vitro Voruntersuchungen konnten zeigen, dass bei unterschiedlichen neuronalen Zellschädigungsmechanismen eine spezifische PD146176-Wirkung auf Neurone besteht²⁰⁰. Deswegen erfolgte die Untersuchung auch in-vivo mit dieser Substanz.

YS121

Die Gruppe von Werz et al. konnte mittels YS121 eine Reduktion der LOX-5-Produkte um ca. 70% erzielen²⁵². Über die Wirkungsweise bei der Maus als Versuchstier und über eventuelle Nebenwirkungen gibt es unserer Kenntnis nach leider nur eine unzureichende Studienlage. Die in-vivo-Versuche zur Wirksamkeit wurden bei der Ratte durchgeführt²⁰⁷. Wir wählten YS121 aufgrund der in-vitro-Vorergebnisse.

Isofluran

Für das verwendete Anästhetikum Isofluran wurden sowohl protektive²⁴² als auch negative Effekte auf die Entwicklung eines sekundären Hirnschadens beschrieben. So erhöhte eine Narkose mit Isofluran den Hirnwassergehalt in traumatisierten Tieren signifikant stärker als eine Narkose mit Sevofluran. Als Ursache hierfür wurde eine Beeinflussung der tight-junctions der Bluthirnschranke propagiert²⁴³. Im Gegensatz hierzu wurde bereits eine protektive Wirkung auf hypoxische Neurone beschrieben, welche auf eine Verminderung der Apoptose zurückgeführt wurde²⁴⁴. Eine tiefere Sedierung mit höheren Dosierungen an Isofluran (1,67 minimale alveoläre Konzentration, MAC) resultiert des Weiteren in einem größeren Nekrosevolumen und einem schlechteren neurologischen Outcome²⁴⁵. In unserer Studie versuchten wir durch eine standardisierte Narkose aller Tiere der verschiedenen Versuchsgruppen den Einfluss der Isofluranwirkung auf unsere Ergebnisse zu eliminieren. Die verwendete Konzentration (zwischen 1 und 1,2 Volumenprozent) entspricht zudem weniger als 1,0 MAC für Isofluran und liegt somit unter den in den vorangegangenen Studien verwendeten Dosen, für welche negative Effekte nachgewiesen wurden. Auch die Dauer der Narkose von weniger als 15 Minuten liegt unter der für die meisten Effekte beschriebenen Mindestdauer^{z.B. 246-248}.

DMSO

Die Löslichkeit beider verwendeter Inhibitoren in Wasser ist schlecht, sodass eine Stammlösung unter der Zugabe des organischen Lösungsmittels DMSO angefertigt wurde (siehe Methodenteil). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass DMSO unter anderem die Entwicklung einer ödematösen Schwellung hemmt²⁵³. Diese Wirkungen treten bereits bei sehr geringen Konzentrationen auf²⁵⁴, sodass auch in der hier durchgeführten Studie eine neben der spezifischen LOX-Inhibition bestehende DMSO-Wirkung nicht ausgeschlossen ist. Auch schädliche Wirkungen von DMSO auf das neurologische Outcome nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma bei der Maus wurden bereits beschrieben²⁵⁵. Da die Kontrollgruppe jedoch eine Vehikellösung mit identischer DMSO-Konzentration erhielt, ist eine mögliche DMSO-Wirkung bei allen Gruppen gleich ausgeprägt.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 LOX-12/15-Inhibition verringert den posttraumatischen Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

Die in unserer Studie erhobenen Ergebnisse zeigen erstmalig in vivo, dass eine Inhibition der Lipoxygenase-12/15 vor Trauma das Gesamtvolumen des Hirnschadens nach Schädelhirntrauma verringert. In-vitro konnte bereits nachgewiesen werden, dass eine LOX-12/15 Inhibition das Gesamtüberleben von neuronalen Zellen nach glutamatinduziertem Schaden verbessert²⁰⁰. In-vivo ist die 12/15-Lipoxygenase an einer Vielzahl von pathophysiologischen Prozessen des ischämischen Hirnschadens beteiligt. Eine Inhibition der LOX-12/15 verbesserte hier in mehreren experimentellen Studien mit unterschiedlichen Schlaganfallmodellen das neurologische Outcome^{256,257}. Eine weitere Studie konnte experimentell bei globalem hypoxischen Hirnschaden nach Herzstillstand eine signifikante Erhöhung der Lipoxygenase-12/15-Spiegel im Gehirn nachweisen und eine Prognose- und Outcomeverbesserung durch die LOX-12/15-Hemmung zeigen²⁵⁸. Die zerebrale Ischämie spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung des posttraumatischen Hirnschadens, sodass eine positive Beeinflussung dieser Komponente durch eine LOX-12/15-Inhibition neuroprotektiv sein sollte. Die möglichen Mechanismen, über die der protektive Effekt vermittelt sein kann, sind vielfältig und betreffen alle Teilaspekte der Entwicklung eines posttraumatischen Hirnschadens (siehe Kap 1.1.4)

Posttraumatische Ödementwicklung

Das post-traumatische Hirnödem setzt sich aus zwei komplementären Komponenten zusammen²⁵⁹, dem zytotoxischen Ödem, welches vor allem durch Zellschwellung der Astrozyten entsteht²⁶⁰, und dem vasogenen Ödem, welches durch eine Störung der Blut-Hirn-Schranke bedingt ist²⁵⁹.

Traditionell wird für den Zeitraum der ersten 24h nach Trauma bereits ein kompliziertes Verhältnis zwischen vasogenem und zytotoxischem Ödem in verschiedenen Hirnregionen postuliert. Das vasogene Ödem resultiert dabei zu diesem Zeitpunkt vor allem aus der Primärläsion, innerhalb derer die Blut-Hirnschranke mechanisch geschädigt wurde²⁵⁹. Jedoch

hat zu diesem Zeitpunkt das zytotoxische Ödem sowohl in der fokalen als auch in der perifokalen Zone und global im Gehirn bereits eine größere Bedeutung für das Gesamtödem²⁶¹. Als mögliche Ursache für ein globales Hirnödem wird eine reduzierte zerebrale Durchblutung nach Schädel-Hirn-Trauma propagiert, die zu multiregionalen oder globalen ischämischen Zuständen führt²⁶²⁻²⁶⁵.

Ist die Versorgung mit energieliefernden Substanzen zu gering, kann es zu einem Funktionsverlust der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ kommen. Dies führt zu einem Netto-Einstrom von Na^+ -Ionen aus dem Extrazellularraum in die Zelle und damit zu einer Zellschwellung aufgrund eines osmotisch bedingten Wassereinstroms. Dieser Vorgang wird durch eine Depolarisierung der Zelle beschleunigt, da zur Wiederherstellung eines Ruhepotentials nach einer Depolarisation mehr Energie benötigt wird als zur reinen Aufrechterhaltung des Membranpotentials. In der Tat ist in der posttraumatischen Phase eine sich zirkulär ausbreitende kortikale (Streu-)Depolarisation bekannt, die sogenannte Cortical Spreading Depolarization (=CSD)²⁶⁶. Diese CSD tritt zum ersten Mal innerhalb von Minuten nach der Läsion auf und kann im sich Verlauf von Stunden bis Tagen mehrfach wiederholen²⁶⁷. Die CSD breitet sich vom Ort des Primärtraumas über die gesamte Hirnoberfläche aus und ist gekennzeichnet durch eine nahezu vollständige Depolarisation der Neuronen und der Astrozyten^{268,269}, was zum einen zu einer massiven Ausschüttung von Transmittern, unter anderem Glutamat²⁷⁰, und aufgrund des oben beschriebenen Mechanismus zu einer Zellschwellung im Sinne eines zytotoxischen Ödems führt. In gesunden Hirnarealen führt eine CSD nicht zum Untergang der Zellen²⁷¹.

Eine Hemmung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ durch die Reaktionsprodukte der Lipoxxygenasen ist bereits mehrfach beschrieben worden²⁷²⁻²⁷⁴, sowohl für die Produkte der 5-LOX²⁷⁵ als auch für die der 12/15-LOX²⁷³. Eine Erklärung für die tendenzielle Reduktion des Hirnwassergehaltes nach Lipoxxygenase-12/15-Hemmung in der nicht-traumatisierten Hemisphäre wäre also ein positiver Effekt auf das zytotoxische Ödem, da durch die Lipoxxygenasehemmung die $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ weniger gehemmt wird. In der traumatisierten Hemisphäre ist dieser Effekt jedoch kaschiert, da aufgrund der bestehenden Ischämie die notwendige Versorgung mit Energieträgern nicht gegeben ist.

Des Weiteren gibt es Hinweise auf eine positive Wirkung einer Lipoxxygenase-12/15-Inhibition auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke. So wurde gezeigt, dass 12-HETE zu

einer Degeneration von Tight Junctions der Endothelzellen führt und somit zu einer Störung der endothelialen Barriere^{276,277}. Durch die neurovaskuläre Einheit im Gehirn besteht ein unmittelbarer Einfluss von Astrozyten und Neuronen auf die intraparenchymatösen Gefäße⁴². Ein protektiver Einfluss auf diese Zelltypen fördert somit sekundär auch die Integrität der Blutgefäße und damit insgesamt der Blut-Hirn-Schranke, was eine Verringerung des vasogenen Ödems bewirken kann.

Insgesamt ist eine protektive Wirkung der LOX-12/15-Hemmung auf die Entstehung des posttraumatischen Ödems sowohl durch eine Reduktion eines vasogenen als auch eines zytotoxischen Ödems denkbar.

Inflammatorische Prozesse

Inflammatorische Vorgänge sind ein essentieller Bestandteil der Heilungsprozesse nach einem Gewebeschaden, also auch nach einem Schädel-Hirn-Trauma, und haben eine Eindämmung der Schäden sowie eine Reparatur des Gewebes zum Ziel²⁷⁸⁻²⁸⁰. Obwohl die Mikrogliazellen als Immunzellen des zentralen Nervensystems bereits innerhalb von wenigen Minuten nach einem Trauma durch Signalmoleküle (v.a. damage-associated-molecular-pattern = DAMPs) aktiviert werden²⁸¹, ist eine signifikante Bedeutung der Immunreaktion für die Entstehung des sekundären Hirnschadens in den ersten 24-48 Stunden aktuell nicht gesichert²⁷⁸.

Wie im Einleitungsteil (Kapitel 1.2) beschrieben, ist die Wirkung der Reaktionsprodukte der Lipooxygenase-12/15 eher als anti-inflammatorisch einzustufen. So kann z.B. 15-HETE die Migration von Leukozyten durch das Endothel hemmen¹⁶¹, was auch mit der generell stabilisierenden Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranke zusammenhängen könnte (siehe vorheriger Abschnitt). Die Produktion der anti-inflammatorischen Lipoxine benötigt eine Beteiligung von LOX-12/15 und LOX-5 und diese Lipoxine scheinen eine zentrale Rolle in der Regulation und Beendigung von Entzündungsvorgängen zu spielen²⁸², indem sie über spezifische Rezeptoren der T-Zellen die Produktion pro-inflammatorischer Moleküle hemmen²⁸³ und die Einwanderung von monozytären Zellen fördern, welche zum Ende einer Entzündungsreaktion den Zelldetritus von zugrunde gegangenen Zellen entfernen¹⁸⁷. Im Gegensatz hierzu sind für Produkte der 12/15-LOX auch pro-inflammatorische Wirkungen beschrieben, so z.B. bei der Entwicklung der Atherosklerose²⁸⁴. Insgesamt scheint die

Wirkung der Lipoxygenasen maßgeblich von den vorhandenen und prozessierten Substraten abzuhängen²⁸². Inwieweit sich diese Ergebnisse, die in peripheren Geweben gewonnen wurden, unmittelbar auf das zentrale Nervensystem übertragen lassen, ist bisher noch nicht vollständig erforscht. Ausgehend von einer eher anti-inflammatorischen Wirkung der Lipoxygenase-12/15-Produkte wäre eine Hemmung selbiger jedoch kontraproduktiv.

Dennoch scheint besonders in neurodegenerativen Erkrankungen, in denen eher chronische Entzündungsvorgänge eine Rolle spielen, wie z.B. die Alzheimer-Erkrankung, eine Lipoxygenase-12/15-Hemmung einen positiven Effekt auf die Entwicklung und das Outcome dieser Erkrankungen zu haben^{285,286}. Auch bei zerebraler Ischämie konnte für 12-HETE und 15-HETE eine anti-inflammatorische Wirkung gezeigt werden. Dies erfolgt über eine Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptors γ (PPAR γ) und wirkt daher durch eine direkte Hemmung pro-inflammatorischer Mediatoren²⁸⁷⁻²⁹⁰.

Insgesamt ist unserer Meinung nach die alleinige Betrachtung der inflammatorischen Vorgänge nicht ausreichend, um die gefundenen Ergebnisse zu erklären. Dies begründet sich zum einen aus den eher anti-inflammatorischen und neuroprotektiven Wirkungen der Lipoxygenase-12/15-Produkte und zum anderen aus der noch nicht vollständig geklärten Signifikanz inflammatorischer Vorgänge bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens innerhalb der ersten 24 Stunden.

Zelluläre Prozesse

Als weiterer Wirkmechanismus der Inhibition der 12/15-Lipoxygenase wird eine Regulation der Apoptose propagiert.

Zum einen kommt es in Zellkulturen nach Glutamat-induziertem Zellschaden zu einer deutlichen Verringerung der intrazellulären Glutathionkonzentration, was wiederum zu einer Steigerung des Lipoxygenasespiegels und dadurch zu einer erhöhten Lipoxygenaseaktivität führt²⁹¹. Eine LOX-12/15-Inhibition führt in-vitro in neuronalen HT-22-Zellen zwar nicht zu einer Erholung des intrazellulären Glutathionspiegels²⁹², kann aber die erhöhte Aktivität der Lipoxygenasen puffern und so zu einer Verringerung des oxidativen Stresses innerhalb der

Zelle führen. Oxidativer Stress ist einer der Hauptauslöser für den Caspase-unabhängigen Zelltod²⁹³.

Wie im Einleitungsteil beschrieben, ist der verstärkte Einstrom von Calcium-Ionen in die Mitochondrien eine wichtige Ursache für oxidativen Stress, da hierdurch die Atmungskette aktiviert wird und so radikale Sauerstoff-Spezies entstehen. Durch eine Verminderung des intramitochondrialen Calciumspiegels könnte also der oxidative Stress reduziert werden. In der Tat legen Studien die Erkenntnis nahe, dass 12-HETE Calciumkanäle regulieren kann²⁹⁴ und zwingend erforderlich ist für den Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle²⁹⁵. In einer Studie konnten Li et al. den Calciumeinstrom in den Intrazellularraum durch LOX-12/15-Inhibition nahezu vollständig verhindern²⁹⁶. Auch der Anstieg des intramitochondrialen Calciumspiegels wird durch 12-HETE geregelt²⁹⁷. Eine Lipoxygenasehemmung kann diesen Ca^{2+} -Konzentrationsanstieg vermindern. Dies kann im Folgenden die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und die dadurch bedingte Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran reduzieren und so den Ausstrom von intramitochondrialen Molekülen in das Cytosol verringern. So wird zum Beispiel die Translokation des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) von den Mitochondrien in den Zellkern durch Inhibition der Lipoxygenase-12/15 deutlich reduziert²⁹⁸. AIF gilt als einer der Hauptfaktoren im Reaktionsweg der Caspase-unabhängigen Apoptose und trägt so maßgeblich zur Entwicklung des sekundären Hirnschadens bei²⁹⁹. Auch eine verminderte Freisetzung von Cytochrom c in den Intrazellularraum und damit verbunden eine gehemmte Bildung des Apoptosoms durch eine LOX-Hemmung ist beschrieben worden^{96,112}.

Eine Lipoxygenasehemmung kann das mitochondriale Membranpotential stabilisieren und so eine Leckage und den damit verbunden Ausstrom von pro-apoptotischen Stoffen verhindern²⁹². Eine mögliche Ursache für die Reduzierung des Gesamtvolumens des sekundären Hirnschadens ist also eine Inhibition der Apoptosevorgänge. Dies gilt im Besonderen für diejenigen Vorgänge, die durch oxidativen Stress ausgelöst werden. Prinzipiell können diese Vorgänge in allen Zellarten des Körpers in ähnlicher Weise ablaufen. Eine besondere Bedeutung beim sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma ergibt sich vermutlich aus den speziellen Eigenschaften der Neurone und Gliazellen im Hinblick auf die synaptische Informationsverarbeitung. Wie bereits beschrieben, führen exzitatorische Neurotransmitter an Synapsen zu einem Calciumeinstrom in diese Zelle. Eine Exzitotoxizität,

wie sie nach einem Schädel-Hirn-Trauma durch den Primärschaden an Neuronen entstehen kann, hat somit eine deutliche Belastung der Zellen durch Calcium zur Folge (siehe Kap. 1.1.4).

Neurologisches Outcome

In unserer Studie geht die Verringerung des sekundären Hirnschadens auf histopathologischer Ebene auch mit einem tendenziell besseren neurologischen Outcome einher. Der Neurological Severity Score, den wir zur Evaluation der klinischen Einschränkungen verwendet haben, bezieht als sog. Composite Score eine Vielzahl von möglichen fokal-neurologischen Ausfällen in die Bewertung mit ein. So werden motorische, sensorische, visuelle und funktionelle Tests gemacht³⁰⁰. Dies hat den Vorteil einer breiten Erfassung möglicher Ausfälle, kann jedoch dadurch die mögliche Betonung einzelner neurologischer Systeme überdecken³⁰⁰. In unserer Studie zeigte sich eine tendenzielle Verbesserung des neurologischen Outcomes nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Dies steht in Einklang mit mehreren Vorstudien, in denen bei verschiedensten neurologischen Erkrankungen durch Lipoxxygenasehemmung eine verbesserte neurologische Funktionalität nachweisen ließ, so vor allem bei experimentellem Schlaganfall^{256,301,302}, aber auch bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer²⁰⁴. In unserer Studie zeigten sich bei allen Versuchstieren relativ geringe Ausfälle. Der maximal aufgetretene NSS eines Einzeltieres war 10 Punkte, der durchschnittliche NSS der schlechtesten Gruppe betrug 5 Punkte. Aufgrund dieser niedrigen Unterschiede zwischen den Gruppen konnte das Signifikanzniveau von 0,05 nicht erreicht werden, eine größere Gruppengröße könnte die Ergebnisse jedoch festigen. In Anbetracht der Studien zum neurologischen Outcome nach Hemmung der 12/15-LOX bei anderen Erkrankungen ist eine positive Wirkung auch beim Schädel-Hirn-Trauma durchaus denkbar und im Hinblick auf unsere Studienergebnisse wahrscheinlich.

Verringerter positiver Effekt bei höheren Inhibitor-Konzentrationen

Ein interessanter Aspekt unserer Ergebnisse ist die Verringerung der positiven Wirkung der Lipoxxygenasehemmung auf den sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma bei höheren applizierten Konzentrationen. Die oben beschriebene Wirkung auf die ablaufenden inflammatorischen Prozesse wäre als eine Ursache für dieses Ergebnis anzusehen, da die Reaktionsprodukte der Lipoxxygenase eher anti-inflammatorisch wirken, eine zu starke Hemmung der Lipoxxygenase somit pro-inflammatorische Effekte haben könnte, die auch bereits in der Frühphase von Bedeutung sind.

Ein weiterer möglicher Grund hierfür liegt in einer beschriebenen neuroprotektiven Wirkung von 12-HETE. Durch die direkte Aktivierung des PPAR γ führt es in experimentellen Schlaganfall- und intraparenchymatösen Blutungs-Studien zu einer Verbesserung des Zellüberlebens und einer Verringerung der Nekrosezonen^{287,290}. Der Verlust der neuroprotektiven Wirkung von 12-HETE könnte also bei höheren Dosierungen den positiven Effekt der Membranstabilisierung maskieren und sich sogar negativ auswirken.

Eine dritte mögliche Ursache für die Verringerung der protektive Wirkung bei höheren Konzentrationen ist die gesteigerte Nutzung alternativer Prozessierungswege für die durch die Lipoxxygenase- Hemmung akkumulierte Arachidonsäure. So wurde zum Beispiel für die Cyclooxygenase-2 eine Steigerung der Aktivität nach Lipoxxygenase-5-Hemmung beschrieben^{303,304}. Dies ist durchaus auch bei einer Lipoxxygenase-12/15-Inhibition denkbar und insofern von Bedeutung, als dass die von der COX-2 synthetisierten Prostaglandine möglicherweise einen verstärkenden Einfluss auf den neurotoxischen Effekt von Glutamat besitzen³⁰⁵. Allerdings sind in der Literatur auch neuroprotektive Effekte von Prostaglandinen beschrieben³⁰⁶ und es scheint nach Schädel-Hirn-Trauma nicht zu einer signifikanten Stimulation der COX-2 Expression zu kommen³⁰⁷, sodass dieser Punkt ein möglicher Ansatz für weitergehende Untersuchungen darstellt.

Zusammenfassung

Zusammenfassend haben also bereits mehrere Studien den positiven Effekt eine Lipoxxygenase-12/15-Inhibition auf das histologische und auch das neurologische Outcome nach neuronaler Schädigungen gezeigt. Unsere Ergebnisse lassen sich in diesem Zusammenhang plausibel dahingegen deuten, dass auch beim experimentellen Schädel-Hirn-Trauma eine LOX-12/15-Inhibition eine neuroprotektive Wirkung hat.

4.2.2. LOX-5-Inhibition durch YS121 hat keinen Einfluss auf das Nekrosevolumen nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma

In der vorliegenden Studie hat die Inhibition der Lipoxxygenase-5 in den verwendeten Konzentrationen 0,3 und 0,6 mg/kg KG keinen Einfluss auf das Nekrosevolumen nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma. Diese Ergebnisse decken sich mit den in-vitro Ergebnissen unserer Kooperationspartner in Marburg, die zeigen konnten, dass die Hemmung der LOX-5 keine signifikante Reduktion des neuronalen Zelltods nach glutamatinduzierten Zellschaden nach sich zieht.

Die Lipoxxygenase-5 ist ebenso wie die 12/15-LOX ubiquitär im Gehirn vorhanden, also auch in Neuronen^{308,309}. Mehrere Studien konnten bereits eine wichtige Rolle von 5-LOX-Produkten bei der Neuroplastizität und der Entwicklung des Gehirns zeigen³¹⁰⁻³¹². Hierbei scheinen vor allem Wachstum und Proliferation neuronaler Stammzellen von Leukotrienen, insbesondere von LTB₄, stimuliert zu werden³¹¹. Diese neuronalen Stammzellen sind an der Reparatur von Schädigungen des Gehirns von Bedeutung, da sie Vorläuferzellen sowohl von Neuronen als auch von Gliazellen sind^{313,314}. Vor diesem Hintergrund wirkt eine Inhibition der Lipoxxygenase-5 auch hemmend auf die endogenen Reparaturmechanismen des Gehirns, was sich durchaus negativ auf die Entwicklung eines sekundären Hirnschadens nach Schädelhirntrauma auswirken kann.

Wie oben bereits beschrieben, sind Entzündungsvorgänge ein unverzichtbarer Bestandteil jedes Heilungsprozesses. So finden auch nach einem Schädel-Hirn-Trauma multiple Inflammationsvorgänge statt^{278,280,281}. Aufgrund der zentralen Bedeutung der Leukotriene eine Entwicklung einer inflammatorischen Reaktion ist es durchaus plausibel, dass eine Hemmung

der Lipoxxygenase-5 im Sinne einer Inhibierung der Leukotrien-Synthese auch über diesen Weg positiv auf die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens einwirkt. Voigt et al. untersuchten die Rolle der Lipoxxygenase-5-Inhibition auf die Entwicklung des sekundären Hirnschadens Schädel-Hirn-Trauma bei Ratten³¹⁵. In dieser Studie zeigte sich bei einer posttraumatischen MRT-Bildgebung 24 Stunden nach Trauma zwar eine tendenzielle, jedoch keine signifikante Reduktion des betroffenen Areals, wobei hier einschränkend erwähnt werden muss, dass die hier beurteilte T2w-Läsion im MRT nicht gleichbedeutend ist mit der histopathologischen Nekrosezone. Die Ergebnisse von Voigt et al zeigten zudem eine weitere Größenzunahme der Nekrosezone im Zeitraum zwischen 24 und 72 Stunden, welcher durch die LOX-5-Inhibition signifikant reduziert werden konnte. Dies kann erklärt werden durch die verzögerte Infiltration durch Makrophagen, die im Gegensatz zu den Granulozyten erst im Zeitraum von Tagen in das geschädigte Gewebe einwandern³¹⁶.

Des Weiteren lässt sich auch hier als möglicher Grund die Aktivierung von alternativen Prozessionswegen der Arachidonsäure anführen (siehe Kap. 4.2.1). Das bedeutet, dass es durch die Hemmung der Lipoxxygenasen zu einer Steigerung der Cyclooxygenasen und damit zu einer vermehrten Produktion von Prostaglandinen kommt, welche möglicherweise einen negativen Effekt auf den glutamatinduzierten Zellschaden haben^{303,304,307} und somit den posttraumatischen Gesamtschaden steigern könnten.

Insgesamt lassen sich unsere Ergebnisse also in der Art deuten, dass eine Lipoxxygenase-5-Hemmung innerhalb der ersten 24 Stunden keinen signifikanten Effekt auf die Entwicklung des sekundären Schädel-Hirn-Traumas hat, da die hiervon betroffenen pathophysiologischen Vorgänge, insbesondere die Anregung der Stammzellen und die Einwanderung der Makrophagen erst nach diesem Zeitraum in signifikantem Ausmaß von statten gehen.

4.3. Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Lipoxxygenase-12/15 den Hirnschaden nach Schädel-Hirn-Trauma vermindern und so das neurologische Outcome im Mausmodell tendenziell verbessern kann. In Zusammenschau mit den in-vitro Vorergebnissen erachten wir hierbei eine Verminderung des oxidativen Stresses als den wahrscheinlichsten Wirkmechanismus. Da oxidativer Stress beim Schädel-Hirn-Trauma eine besondere Rolle spielt, scheint dies ein lohnendes Ziel einer pharmakologischen Therapie darzustellen.

Aufgrund der komplizierten Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens ist es unserer Meinung nach unwahrscheinlich, dass ein einzelner Wirkstoff als alleiniges Medikament ausreicht, um eine signifikante Verbesserung des Outcomes beim Menschen zu erreichen. Vielmehr deutet die Studienlage daraufhin, dass es mehrere vielversprechende Angriffspunkte zur Therapie gibt, was die vaskuläre, die inflammatorische und die zelluläre Ebene betrifft. Eine erfolgreiche Therapie sollte alle Ebenen der Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma berücksichtigen.

In dieser Hinsicht ist die Hemmung der Lipoxxygenase-12/15 ein vielversprechender Teilaspekt in der Behandlung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma. Die aus den hier vorliegenden Ergebnissen mögliche geringe therapeutische Breite könnte durch Kombination mit anderen Wirkstoffen kompensiert werden. Dies erfordert jedoch ein tiefergehendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge und daher weitere Forschung.

5. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma gehört seit vielen Jahren in Deutschland zu den zehn häufigsten Ursachen für einen stationären Krankenhausaufenthalt und generell in Industrienationen zu den häufigsten Todesursachen für Menschen unter 45 Jahren.

Das sog. Primärtrauma, also die ursprüngliche (funktionseinschränkende) Gewalteinwirkung auf das Gehirn, ist keiner kausalen Therapie zugänglich, sondern nur präventiv zu vermeiden. Als Folge des primären Schadens kommt es zu unterschiedlichen pathophysiologischen Vorgängen, die gemeinsam ohne weiteres Trauma zu einer deutlichen Größenzunahme der primären Läsion führen, dem sogenannten sekundären Hirnschaden. Bei der Entwicklung des sekundären Hirnschadens lassen sich inflammatorische, vaskuläre und zelluläre Vorgänge identifizieren, die jedoch teilweise zeitgleich ablaufen und sich in erheblichem Maße gegenseitig beeinflussen. Diese beteiligten Prozesse sind prinzipiell aufgrund ihres verzögerten Auftretens durch eine medikamentöse Therapie beeinflussbar.

Ein Anteil des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma kann auf oxidativen Stress zurückgeführt werden, insbesondere auf eine Schädigung der betroffenen Zellen durch reaktive Sauerstoffspezies (engl. radical oxygen species = ROS), die Lipide und DNA schädigen können.

Als ein vielversprechendes Ziel zur Therapie des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma wurden die Lipoxygenasen identifiziert, die an der Oxidation von Lipiden und somit an der physiologischen Entstehung von ROS beteiligt sind. Eine Beteiligung der Lipoxygenasen konnte bereits bei der Pathophysiologie des Schlaganfalls und bei der Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung nachgewiesen werden, sodass eine Bedeutung in der Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma durchaus denkbar ist.

In einer in-vitro-Studie konnten unsere Kollaborationspartner bereits einen positiven Effekt der Lipoxygenase-15-Inhibition auf das neuronale Zellüberleben nach glutamatinduzierten Zellschaden zeigen. Vor diesem Hintergrund war das Ziel unserer Studie die Evaluation der Wirksamkeit der LOX-15-Inhibition auf die Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma im Mausmodell.

In einer ersten Versuchsserie konnte gezeigt werden, dass eine Lipoxygenase-12/15-Hemmung das Nekrosevolumen 24 Stunden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma durch Controlled-Cortical-Impact signifikant verringert. Das neurologische Outcome zeigte eine tendenzielle Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Durch Hemmung der Lipoxygenase-5 konnte keine signifikante Reduktion der Nekrosezone erreicht werden.

Eine Dosisfindungsserie zeigte bei höheren Konzentrationen des Lipoxygenase-12/15-Inhibitors einen geringeren protektiven Effekt auf die Entwicklung eines sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma und eine Annäherung der Nekrosevolumina an die Kontrollgruppe.

Der Hirnwassergehalt 24 Stunden nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma wurde durch die Inhibition der Lipoxygenase-12/15 nicht signifikant reduziert. Der mutmaßliche Wirkmechanismus greift also nicht signifikant in die posttraumatische Ödementwicklung ein.

Als wahrscheinlichsten Mechanismus der protektiven Wirkung einer Lipoxygenase-12/15-Inhibition bei der Entwicklung eines sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn-Trauma erachten wir daher eine zelluläre Schutzfunktion durch Regulation des oxidativen Stresses. Der genaue Wirkmechanismus muss jedoch in weiteren Studien erforscht werden.

6. Quellenverzeichnis

- 1 Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie. *Leitlinie Schädelhirntrauma im Erwachsenenalter* (2015).
- 2 Centers for Disease Control and Prevention. *Report to Congress on Traumatic Brain Injury in the United States: Epidemiology and Rehabilitation* (2015).
- 3 Teasdale, G. & Jennett, B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* **2**, 81-84, (1974).
- 4 McDonald, C. M. *et al.* Comparison of indices of traumatic brain injury severity as predictors of neurobehavioral outcome in children. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **75**, 328-337, (1994).
- 5 Popescu, C., Anghelescu, A., Daia, C. & Onose, G. Actual data on epidemiological evolution and prevention endeavours regarding traumatic brain injury. *J Med Life* **8**, 272-277, (2015).
- 6 Maas, A. Traumatic brain injury: Changing concepts and approaches. *Chin J Traumatol* **19**, 3-6, (2016).
- 7 Kristman, V. L. *et al.* Methodological issues and research recommendations for prognosis after mild traumatic brain injury: results of the International Collaboration on Mild Traumatic Brain Injury Prognosis. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **95**, S265-277, (2014).
- 8 Roozenbeek, B., Maas, A. I. & Menon, D. K. Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* **9**, 231-236, (2013).
- 9 Cassidy, J. D. *et al.* Incidence, risk factors and prevention of mild traumatic brain injury: results of the WHO Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury. *J Rehabil Med*, 28-60, (2004).
- 10 Gesundheitsberichterstattung des Bundes. *Diagnosedaten der Krankenhäuser ab 2000 für die 10/20/50/100 häufigsten Diagnosen (Fälle, Verweildauer, Anteile). Gliederungsmerkmale: Jahre, Behandlungsort, Alter, Geschlecht, Verweildauerklassen, ICD10* (Aufruf über Website www.gbe-bund.de 01.08.2017).
- 11 Faul, M. X., L; Wald, MM; Coronado, VG;. (eds Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention & National Center for Injury Prevention and Control;) (2010).
- 12 Dewan, M. C., Mummareddy, N., Wellons, J. C., 3rd & Bonfield, C. M. The epidemiology of global pediatric traumatic brain injury: a qualitative review. *World Neurosurg*, (2016).
- 13 Nathanson, J. T. *et al.* Concussion Incidence in Professional Football: Position-Specific Analysis With Use of a Novel Metric. *Orthop J Sports Med* **4**, 2325967115622621, (2016).
- 14 Levy, M. L. *et al.* Concussions in soccer: a current understanding. *World Neurosurg* **78**, 535-544, (2012).
- 15 McCuen, E. *et al.* Collegiate women's soccer players suffer greater cumulative head impacts than their high school counterparts. *J Biomech* **48**, 3720-3723, (2015).

- 16 Brazinova, A. *et al.* Epidemiology of traumatic brain injury in Europe: a living systematic review. *J Neurotrauma*, (2015).
- 17 Symonds, C. P. Observations on the differential diagnosis and treatment of cerebral states consequent upon head injuries. *Br Med J* **2**, 829-832, (1928).
- 18 Saatman, K. E. *et al.* Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* **25**, 719-738, (2008).
- 19 Beynon, C. & Unterberg, A. W. [Severe traumatic brain injury]. *Unfallchirurg* **114**, 713-721; quiz 722-713, (2011).
- 20 Stevens, R. D. & Sutter, R. Prognosis in severe brain injury. *Critical care medicine* **41**, 1104-1123, (2013).
- 21 Nyam, T. E. *et al.* FOUR Score Predicts Early Outcome in Patients After Traumatic Brain Injury. *Neurocrit Care* **26**, 225-231, (2017).
- 22 Saatman, K. E. *et al.* Classification of traumatic brain injury for targeted therapies. *J Neurotrauma* **25**, 719-738, (2008).
- 23 Gennarelli, T. A. *et al.* Influence of the type of intracranial lesion on outcome from severe head injury. *Journal of neurosurgery* **56**, 26-32, (1982).
- 24 Marshall, L. F. *et al.* The diagnosis of head injury requires a classification based on computed axial tomography. *J Neurotrauma* **9 Suppl 1**, S287-292, (1992).
- 25 McLafferty, F. S. *et al.* Predictors of improved functional outcome following inpatient rehabilitation for patients with traumatic brain injury. *NeuroRehabilitation* **39**, 423-430, (2016).
- 26 Wijayatilake, D. S., Jigajinni, S. V. & Sherren, P. B. Traumatic brain injury: physiological targets for clinical practice in the prehospital setting and on the Neuro-ICU. *Curr Opin Anaesthesiol* **28**, 517-524, (2015).
- 27 Liu-DeRyke, X. *et al.* Clinical impact of early hyperglycemia during acute phase of traumatic brain injury. *Neurocrit Care* **11**, 151-157, (2009).
- 28 McCrory, P. *et al.* Consensus statement on concussion in sport--the 3rd International Conference on concussion in sport, held in Zurich, November 2008. *J Clin Neurosci* **16**, 755-763, (2009).
- 29 Ponsford, J., Cameron, P., Fitzgerald, M., Grant, M. & Mikocka-Walus, A. Long-term outcomes after uncomplicated mild traumatic brain injury: a comparison with trauma controls. *J Neurotrauma* **28**, 937-946, (2011).
- 30 Scorza, K. A., Raleigh, M. F. & O'Connor, F. G. Current concepts in concussion: evaluation and management. *Am Fam Physician* **85**, 123-132, (2012).
- 31 Lakhan, S. E. & Kirchgessner, A. Chronic traumatic encephalopathy: the dangers of getting "dinged". *Springerplus* **1**, 2, (2012).
- 32 Murray, G. D. *et al.* Multivariable prognostic analysis in traumatic brain injury: results from the IMPACT study. *J Neurotrauma* **24**, 329-337, (2007).

- 33 Greenwald, B. D., Burnett, D. M. & Miller, M. A. Congenital and acquired brain injury. 1. Brain injury: epidemiology and pathophysiology. *Archives of physical medicine and rehabilitation* **84**, S3-7, (2003).
- 34 Flint, A. C., Manley, G. T., Gean, A. D., Hemphill, J. C., 3rd & Rosenthal, G. Post-operative expansion of hemorrhagic contusions after unilateral decompressive hemicraniectomy in severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **25**, 503-512, (2008).
- 35 Adams, J. H., Graham, D. I. & Gennarelli, T. A. Head injury in man and experimental animals: neuropathology. *Acta neurochirurgica. Supplementum* **32**, 15-30, (1983).
- 36 Graham, D. I. Pathophysiologic aspects of injury and mechanisms of injury In: Rosenthal M (ed) *Rehabilitation of the Adult and Child With Traumatic Brain Injury*, Philadelphia: Davis (1999) 19-41.
- 37 Thomas, M. & Dufour, L. Challenges of diffuse axonal injury diagnosis. *Rehabilitation nursing : the official journal of the Association of Rehabilitation Nurses* **34**, 179-180, (2009).
- 38 Kinoshita, T. *et al.* Conspicuity of diffuse axonal injury lesions on diffusion-weighted MR imaging. *European journal of radiology* **56**, 5-11, (2005).
- 39 Maas, A. I., Stocchetti, N. & Bullock, R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *Lancet neurology* **7**, 728-741, (2008).
- 40 Buki, A., Koizumi, H. & Povlishock, J. T. Moderate posttraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury. *Experimental neurology* **159**, 319-328, (1999).
- 41 Lecrux, C. & Hamel, E. The neurovascular unit in brain function and disease. *Acta Physiol (Oxf)* **203**, 47-59, (2011).
- 42 Jullienne, A. *et al.* Chronic cerebrovascular dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci Res* **94**, 609-622, (2016).
- 43 Filosa, J. A., Morrison, H. W., Iddings, J. A., Du, W. & Kim, K. J. Beyond neurovascular coupling, role of astrocytes in the regulation of vascular tone. *Neuroscience* **323**, 96-109, (2016).
- 44 Iadecola, C. & Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nature neuroscience* **10**, 1369-1376, (2007).
- 45 Nava, E. & Llorens, S. The paracrine control of vascular motion. A historical perspective. *Pharmacol Res* **113**, 125-145, (2016).
- 46 Hamel, E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol (1985)* **100**, 1059-1064, (2006).
- 47 Hawkins, B. T. & Davis, T. P. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev* **57**, 173-185, (2005).
- 48 Wolff, A., Antfolk, M., Brodin, B. & Tenje, M. In Vitro Blood-Brain Barrier Models-An Overview of Established Models and New Microfluidic Approaches. *J Pharm Sci* **104**, 2727-2746, (2015).
- 49 DeWitt, D. S. & Prough, D. S. Traumatic cerebral vascular injury: the effects of concussive brain injury on the cerebral vasculature. *J Neurotrauma* **20**, 795-825, (2003).

- 50 Kenney, K. *et al.* Cerebral Vascular Injury in Traumatic Brain Injury. *Experimental neurology* **275 Pt 3**, 353-366, (2016).
- 51 Armstead, W. M. Differential activation of ERK, p38, and JNK MAPK by nociceptin/orphanin FQ in the potentiation of prostaglandin cerebrovasoconstriction after brain injury. *European journal of pharmacology* **529**, 129-135, (2006).
- 52 Otsu, Y. *et al.* Calcium dynamics in astrocyte processes during neurovascular coupling. *Nature neuroscience* **18**, 210-218, (2015).
- 53 Lind, B. L., Brazhe, A. R., Jessen, S. B., Tan, F. C. & Lauritzen, M. J. Rapid stimulus-evoked astrocyte Ca²⁺ elevations and hemodynamic responses in mouse somatosensory cortex in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E4678-4687, (2013).
- 54 Gordon, G. R., Choi, H. B., Rungta, R. L., Ellis-Davies, G. C. & MacVicar, B. A. Brain metabolism dictates the polarity of astrocyte control over arterioles. *Nature* **456**, 745-749, (2008).
- 55 Kelly, D. F. *et al.* Hyperemia following traumatic brain injury: relationship to intracranial hypertension and outcome. *Journal of neurosurgery* **85**, 762-771, (1996).
- 56 Martin, N. A. *et al.* Characterization of cerebral hemodynamic phases following severe head trauma: hypoperfusion, hyperemia, and vasospasm. *Journal of neurosurgery* **87**, 9-19, (1997).
- 57 Bouma, G. J. *et al.* Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *Journal of neurosurgery* **77**, 360-368, (1992).
- 58 Inoue, Y. *et al.* Changes in cerebral blood flow from the acute to the chronic phase of severe head injury. *J Neurotrauma* **22**, 1411-1418, (2005).
- 59 Armin, S. S., Colohan, A. R. & Zhang, J. H. Traumatic subarachnoid hemorrhage: our current understanding and its evolution over the past half century. *Neurol Res* **28**, 445-452, (2006).
- 60 Stein, S. C. & Smith, D. H. Coagulopathy in traumatic brain injury. *Neurocrit Care* **1**, 479-488, (2004).
- 61 Schwarzmaier, S. M., Kim, S. W., Trabold, R. & Plesnila, N. Temporal profile of thrombogenesis in the cerebral microcirculation after traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **27**, 121-130, (2010).
- 62 Shlosberg, D., Benifla, M., Kaufer, D. & Friedman, A. Blood-brain barrier breakdown as a therapeutic target in traumatic brain injury. *Nat Rev Neurol* **6**, 393-403, (2010).
- 63 Habgood, M. D. *et al.* Changes in blood-brain barrier permeability to large and small molecules following traumatic brain injury in mice. *Eur J Neurosci* **25**, 231-238, (2007).
- 64 Jin, X., Ishii, H., Bai, Z., Itokazu, T. & Yamashita, T. Temporal changes in cell marker expression and cellular infiltration in a controlled cortical impact model in adult male C57BL/6 mice. *PloS one* **7**, e41892, (2012).
- 65 Hickey, W. F. & Kimura, H. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* **239**, 290-292, (1988).
- 66 Loane, D. J. & Kumar, A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Experimental neurology* **275 Pt 3**, 316-327, (2016).

- 67 Hernandez-Ontiveros, D. G. *et al.* Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury. *Front Neurol* **4**, 30, (2013).
- 68 Kumar, A. & Loane, D. J. Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention. *Brain Behav Immun* **26**, 1191-1201, (2012).
- 69 Chhor, V. *et al.* Characterization of phenotype markers and neuronotoxic potential of polarised primary microglia in vitro. *Brain Behav Immun* **32**, 70-85, (2013).
- 70 Hu, X. *et al.* Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063-3070, (2012).
- 71 Hurtado-Alvarado, G., Dominguez-Salazar, E., Pavon, L., Velazquez-Moctezuma, J. & Gomez-Gonzalez, B. Blood-Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low-Grade Inflammation May Be the Link. *J Immunol Res* **2016**, 4576012, (2016).
- 72 Clark, R. S., Schiding, J. K., Kaczorowski, S. L., Marion, D. W. & Kochanek, P. M. Neutrophil accumulation after traumatic brain injury in rats: comparison of weight drop and controlled cortical impact models. *J Neurotrauma* **11**, 499-506, (1994).
- 73 Rhodes, J. Peripheral immune cells in the pathology of traumatic brain injury? *Curr Opin Crit Care* **17**, 122-130, (2011).
- 74 Ransohoff, R. M. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis* **186 Suppl 2**, S152-156, (2002).
- 75 Kim, H. J., Fillmore, H. L., Reeves, T. M. & Phillips, L. L. Elevation of hippocampal MMP-3 expression and activity during trauma-induced synaptogenesis. *Experimental neurology* **192**, 60-72, (2005).
- 76 Madathil, S. K. *et al.* Astrocyte-Specific Overexpression of Insulin-Like Growth Factor-1 Protects Hippocampal Neurons and Reduces Behavioral Deficits following Traumatic Brain Injury in Mice. *PloS one* **8**, e67204, (2013).
- 77 Kim, J. H., Min, K. J., Seol, W., Jou, I. & Joe, E. H. Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *J Neurochem* **115**, 1161-1171, (2010).
- 78 Karve, I. P., Taylor, J. M. & Crack, P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol* **173**, 692-702, (2016).
- 79 Lozano, D. *et al.* Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities. *Neuropsychiatr Dis Treat* **11**, 97-106, (2015).
- 80 Werner, C. & Engelhard, K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* **99**, 4-9, (2007).
- 81 Matute, C., Alberdi, E., Ibarretxe, G. & Sanchez-Gomez, M. V. Excitotoxicity in glial cells. *European journal of pharmacology* **447**, 239-246, (2002).
- 82 Krishnamurthy, K. & Laskowitz, D. T. in *Translational Research in Traumatic Brain Injury Frontiers in Neuroscience* (eds D. Laskowitz & G. Grant) (2016).
- 83 Lisman, J. E., Raghavachari, S. & Tsien, R. W. The sequence of events that underlie quantal transmission at central glutamatergic synapses. *Nat Rev Neurosci* **8**, 597-609, (2007).

- 84 Rosenberg, P. A., Amin, S. & Leitner, M. Glutamate uptake disguises neurotoxic potency of glutamate agonists in cerebral cortex in dissociated cell culture. *J Neurosci* **12**, 56-61, (1992).
- 85 Tzingounis, A. V. & Wadiche, J. I. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nat Rev Neurosci* **8**, 935-947, (2007).
- 86 Danbolt, N. C. Glutamate uptake. *Progress in neurobiology* **65**, 1-105, (2001).
- 87 Alexander, S. P., Mathie, A. & Peters, J. A. Guide to receptors and channels, 2nd edition. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 3**, S1-168, (2006).
- 88 Madden, D. R. The structure and function of glutamate receptor ion channels. *Nat Rev Neurosci* **3**, 91-101, (2002).
- 89 Brini, M., Cali, T., Ottolini, D. & Carafoli, E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* **71**, 2787-2814, (2014).
- 90 Post, R. L., Hegyvary, C. & Kume, S. Activation by adenosine triphosphate in the phosphorylation kinetics of sodium and potassium ion transport adenosine triphosphatase. *J Biol Chem* **247**, 6530-6540, (1972).
- 91 Pan, S., Ryu, S. Y. & Sheu, S. S. Distinctive characteristics and functions of multiple mitochondrial Ca²⁺ influx mechanisms. *Sci China Life Sci* **54**, 763-769, (2011).
- 92 Bernard, C. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds J. L. Noebels *et al.*) (2012).
- 93 Nadler, J. V. in *Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies* (eds J. L. Noebels *et al.*) (2012).
- 94 Zsurka, G. & Kunz, W. S. Mitochondrial dysfunction and seizures: the neuronal energy crisis. *Lancet neurology* **14**, 956-966, (2015).
- 95 Cheng, G., Kong, R. H., Zhang, L. M. & Zhang, J. N. Mitochondria in traumatic brain injury and mitochondrial-targeted multipotential therapeutic strategies. *Br J Pharmacol* **167**, 699-719, (2012).
- 96 Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A. & Mammucari, C. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews. Molecular cell biology* **13**, 566-578, (2012).
- 97 Kirichok, Y., Krapivinsky, G. & Clapham, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**, 360-364, (2004).
- 98 Jouaville, L. S., Pinton, P., Bastianutto, C., Rutter, G. A. & Rizzuto, R. Regulation of mitochondrial ATP synthesis by calcium: evidence for a long-term metabolic priming. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13807-13812, (1999).
- 99 Salminen, L. E. & Paul, R. H. Oxidative stress and genetic markers of suboptimal antioxidant defense in the aging brain: a theoretical review. *Rev Neurosci* **25**, 805-819, (2014).
- 100 Kostyuk, V. A. & Potapovich, A. I. Mechanisms of the suppression of free radical overproduction by antioxidants. *Front Biosci (Elite Ed)* **1**, 179-188, (2009).
- 101 Hiebert, J. B., Shen, Q., Thimmesch, A. R. & Pierce, J. D. Traumatic brain injury and mitochondrial dysfunction. *Am J Med Sci* **350**, 132-138, (2015).

- 102 Patel, M. Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends Pharmacol Sci*, (2016).
- 103 Sinet, P. M., Heikkila, R. E. & Cohen, G. Hydrogen peroxide production by rat brain in vivo. *J Neurochem* **34**, 1421-1428, (1980).
- 104 Drechsel, D. A. & Patel, M. Respiration-dependent H₂O₂ removal in brain mitochondria via the thioredoxin/peroxiredoxin system. *J Biol Chem* **285**, 27850-27858, (2010).
- 105 Yang, Y. & Sauve, A. A. NAD⁺ metabolism: Bioenergetics, signaling and manipulation for therapy. *Biochim Biophys Acta*, (2016).
- 106 Ray, R. S. & Katyal, A. Myeloperoxidase: Bridging the gap in neurodegeneration. *Neurosci Biobehav Rev* **68**, 611-620, (2016).
- 107 Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* **26**, 239-257, (1972).
- 108 Giorgi, C. *et al.* Mitochondrial Ca(2+) and apoptosis. *Cell calcium* **52**, 36-43, (2012).
- 109 Alnemri, E. S. *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* **87**, 171, (1996).
- 110 Nicholson, D. W. & Thornberry, N. A. Caspases: killer proteases. *Trends in biochemical sciences* **22**, 299-306, (1997).
- 111 Dingledine, R., Varvel, N. H. & Dudek, F. E. When and how do seizures kill neurons, and is cell death relevant to epileptogenesis? *Adv Exp Med Biol* **813**, 109-122, (2014).
- 112 Kasahara, A. & Scorrano, L. Mitochondria: from cell death executioners to regulators of cell differentiation. *Trends Cell Biol* **24**, 761-770, (2014).
- 113 Vanden Berghe, T., Kaiser, W. J., Bertrand, M. J. & Vandenabeele, P. Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling. *Mol Cell Oncol* **2**, e975093, (2015).
- 114 Xu, G. Y., Liu, S., Hughes, M. G. & McAdoo, D. J. Glutamate-induced losses of oligodendrocytes and neurons and activation of caspase-3 in the rat spinal cord. *Neuroscience* **153**, 1034-1047, (2008).
- 115 Eldadah, B. A. & Faden, A. I. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J Neurotrauma* **17**, 811-829, (2000).
- 116 Sulejczak, D., Grieb, P., Walski, M. & Frontczak-Baniewicz, M. Apoptotic death of cortical neurons following surgical brain injury. *Folia neuropathologica / Association of Polish Neuropathologists and Medical Research Centre, Polish Academy of Sciences* **46**, 213-219, (2008).
- 117 Han, J., Zhong, C. Q. & Zhang, D. W. Programmed necrosis: backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nat Immunol* **12**, 1143-1149, (2011).
- 118 Leist, M. & Jaattela, M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nature reviews. Molecular cell biology* **2**, 589-598, (2001).
- 119 Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation* **19**, 107-120, (2012).

- 120 Bayir, H., Kochanek, P. M. & Kagan, V. E. Oxidative stress in immature brain after traumatic brain injury. *Dev Neurosci* **28**, 420-431, (2006).
- 121 Gutteridge, J. M. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* **41**, 1819-1828, (1995).
- 122 Hall, E. D. in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects Frontiers in Neuroengineering* (ed F. H. Kobeissy) (2015).
- 123 Sevanian, A. & Hochstein, P. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu Rev Nutr* **5**, 365-390, (1985).
- 124 Niki, E. Lipid peroxidation: physiological levels and dual biological effects. *Free Radic Biol Med* **47**, 469-484, (2009).
- 125 Brash, A. R. Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 23679-23682, (1999).
- 126 Kuhn, H. *et al.* Structural biology of mammalian lipoxygenases: Enzymatic consequences of targeted alterations of the protein structure. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 93-101, (2005).
- 127 Ivanov, I. *et al.* Molecular enzymology of lipoxygenases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **503**, 161-174, (2010).
- 128 Kuban, R. J. *et al.* The iron ligand sphere geometry of mammalian 15-lipoxygenases. *Biochem J* **332** (Pt 1), 237-242, (1998).
- 129 Gilbert, N. C. *et al.* Conversion of human 5-lipoxygenase to a 15-lipoxygenase by a point mutation to mimic phosphorylation at Serine-663. *FASEB J* **26**, 3222-3229, (2012).
- 130 Feussner, I. & Kühn, H. in *Enzymes in Lipid Modification* (ed U. T. Bornscheuer) 309-336 (2000).
- 131 Feussner, I. & Wasternack, C. The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol* **53**, 275-297, (2002).
- 132 Haeggstrom, J. Z. & Funk, C. D. Lipoxygenase and leukotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease. *Chemical reviews* **111**, 5866-5898, (2011).
- 133 Gillmor, S. A., Villasenor, A., Fletterick, R., Sigal, E. & Browner, M. F. The structure of mammalian 15-lipoxygenase reveals similarity to the lipases and the determinants of substrate specificity. *Nat Struct Biol* **4**, 1003-1009, (1997).
- 134 Sloane, D. L., Leung, R., Barnett, J., Craik, C. S. & Sigal, E. Conversion of human 15-lipoxygenase to an efficient 12-lipoxygenase: the side-chain geometry of amino acids 417 and 418 determine positional specificity. *Protein Eng* **8**, 275-282, (1995).
- 135 Schewe, T. 15-Lipoxygenase-1: A Prooxidant Enzyme. *Biological Chemistry* **383**, 365-374, (2005).
- 136 Gareth D. Jones, Linda Russell, Victor M. Darley-Usmar, David Stone, a. & Michael T. Wilson. Role of Lipid Hydroperoxides in the Activation of 15-Lipoxygenase. (1996).

- 137 Kuhn, H., Walther, M. & Kuban, R. J. Mammalian arachidonate 15-lipoxygenases structure, function, and biological implications. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 263-290, (2002).
- 138 Kuhn, H. & Thiele, B. J. The diversity of the lipoxygenase family. Many sequence data but little information on biological significance. *FEBS Lett* **449**, 7-11, (1999).
- 139 Conrad, D. J., Kuhn, H., Mulkins, M., Highland, E. & Sigal, E. Specific inflammatory cytokines regulate the expression of human monocyte 15-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 217-221, (1992).
- 140 Nassar, G. M., Morrow, J. D., Roberts, L. J., 2nd, Lakkis, F. G. & Badr, K. F. Induction of 15-lipoxygenase by interleukin-13 in human blood monocytes. *J Biol Chem* **269**, 27631-27634, (1994).
- 141 Heydeck, D. *et al.* Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. *Blood* **92**, 2503-2510, (1998).
- 142 Berger, M. *et al.* Simultaneous expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase and reticulocyte-type 15-lipoxygenase in rabbits. *J Mol Biol* **278**, 935-948, (1998).
- 143 Brash, A. R., Boeglin, W. E. & Chang, M. S. Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 6148-6152, (1997).
- 144 Krieg, P., Kinzig, A., Heidt, M., Marks, F. & Furstenberger, G. cDNA cloning of a 8-lipoxygenase and a novel epidermis-type lipoxygenase from phorbol ester-treated mouse skin. *Biochim Biophys Acta* **1391**, 7-12, (1998).
- 145 Ludwig, P. *et al.* A kinetic model for lipoxygenases based on experimental data with the lipoxygenase of reticulocytes. *Eur J Biochem* **168**, 325-337, (1987).
- 146 Borgeat, P. Biochemistry of the lipoxygenase pathways in neutrophils. *Can J Physiol Pharmacol* **67**, 936-942, (1989).
- 147 Joo, Y. C. & Oh, D. K. Lipoxygenases: potential starting biocatalysts for the synthesis of signaling compounds. *Biotechnol Adv* **30**, 1524-1532, (2012).
- 148 National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database, *SID=315668989*, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/substance/315668989>> (Aufruf 01.08.2017)
- 149 National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database, *SID=312191545*, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/substance/312191545>> (Aufruf 01.08.2017)
- 150 National Center for Biotechnology Information. PubChem Substance Database, *SID=125673232*, <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/emedien.ub.uni-muenchen.de/substance/125673232>>, (Aufruf 01.08.2017)
- 151 Johnson, E. N., Brass, L. F. & Funk, C. D. Increased platelet sensitivity to ADP in mice lacking platelet-type 12-lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3100-3105, (1998).
- 152 Porro, B., Songia, P., Squellerio, I., Tremoli, E. & Cavalca, V. Analysis, physiological and clinical significance of 12-HETE: A neglected platelet-derived 12-lipoxygenase product. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, (2014).

- 153 Chang, J., Blazek, E., Kreft, A. F. & Lewis, A. J. Inhibition of platelet and neutrophil phospholipase A2 by hydroxyeicosatetraenoic acids (HETES). A novel pharmacological mechanism for regulating free fatty acid release. *Biochem Pharmacol* **34**, 1571-1575, (1985).
- 154 Fonlupt, P., Croset, M. & Lagarde, M. 12-HETE inhibits the binding of PGH2/TXA2 receptor ligands in human platelets. *Thromb Res* **63**, 239-248, (1991).
- 155 Nyby, M. D. *et al.* Platelet lipoxygenase inhibitors attenuate thrombin- and thromboxane mimetic-induced intracellular calcium mobilization and platelet aggregation. *J Pharmacol Exp Ther* **278**, 503-509, (1996).
- 156 Piomelli, D. *et al.* Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. **328**, 38-43, (1987).
- 157 Schewe, T., Rapoport, S. M. & Kuhn, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **58**, 191-272, (1986).
- 158 Rapoport, S. M., Schewe, T., Thiele, B. & Dubiel, W. The role of lipoxygenase and ATP-dependent proteolysis in the maturation of the reticulocyte. *Prog Clin Biol Res* **102 pt A**, 47-58, (1982).
- 159 Vijayvergiya, C. *et al.* High-level expression of rabbit 15-lipoxygenase induces collapse of the mitochondrial pH gradient in cell culture. *Biochemistry* **43**, 15296-15302, (2004).
- 160 Smith, R. J., Justen, J. M., Nidy, E. G., Sam, L. M. & Bleasdale, J. E. Transmembrane signaling in human polymorphonuclear neutrophils: 15(S)-hydroxy-(5Z,8Z,11Z,13E)-eicosatetraenoic acid modulates receptor agonist-triggered cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7270-7274, (1993).
- 161 Takata, S. *et al.* 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibits neutrophil migration across cytokine-activated endothelium. *Am J Pathol* **145**, 541-549, (1994).
- 162 Herlin, T. *et al.* 15-HETE inhibits leukotriene B4 formation and synovial cell proliferation in experimental arthritis. *Agents Actions* **29**, 52-53, (1990).
- 163 Maccarrone, M. *et al.* Activation of different lipoxygenase isozymes induces apoptosis in human erythroleukemia and neuroblastoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* **272**, 345-350, (2000).
- 164 Maccarrone, M., Salucci, M. L., Melino, G., Rosato, N. & Finazzi-Agro, A. The early phase of apoptosis in human neuroblastoma CHP100 cells is characterized by lipoxygenase-dependent ultraweak light emission. *Biochem Biophys Res Commun* **265**, 758-762, (1999).
- 165 Tehrani, M. T. Y. & Fatemeh, K. Apoptosis Induced by 13-S-hydroxyoctadecadienoic acid in the Breast Cancer Cell Lines, MCF-7 and MDA-MB-231. (2013).
- 166 Song, L. *et al.* Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways. *Apoptosis* **19**, 567-580, (2014).
- 167 Borgeat, P., Hamberg, M. & Samuelsson, B. Transformation of arachidonic acid and homo-gamma-linolenic acid by rabbit polymorphonuclear leukocytes. Monohydroxy acids from novel lipoxygenases. *J Biol Chem* **251**, 7816-7820, (1976).

- 168 Radmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 211-234, (2002).
- 169 Prigge, S. T., Boyington, J. C., Gaffney, B. J. & Amzel, L. M. Structure conservation in lipoxygenases: structural analysis of soybean lipoxygenase-1 and modeling of human lipoxygenases. *Proteins* **24**, 275-291, (1996).
- 170 Radmark, O. Arachidonate 5-lipoxygenase. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**, 171-184, (1995).
- 171 Peters-Golden, M. & Henderson, W. R., Jr. Leukotrienes. *N Engl J Med* **357**, 1841-1854, (2007).
- 172 Shimizu, T., Radmark, O. & Samuelsson, B. Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A4 synthesis from arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 689-693, (1984).
- 173 Rouzer, C. A., Matsumoto, T. & Samuelsson, B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 857-861, (1986).
- 174 Maas, R. L., Ingram, C. D., Taber, D. F., Oates, J. A. & Brash, A. R. Stereospecific removal of the DR hydrogen atom at the 10-carbon of arachidonic acid in the biosynthesis of leukotriene A4 by human leukocytes. *J Biol Chem* **257**, 13515-13519, (1982).
- 175 Panossian, A., Hamberg, M. & Samuelsson, B. On the mechanism of biosynthesis of leukotrienes and related compounds. *FEBS Lett* **150**, 511-513, (1982).
- 176 Haeggstrom, J. Z. Leukotriene A4 hydrolase/aminopeptidase, the gatekeeper of chemotactic leukotriene B4 biosynthesis. *J Biol Chem* **279**, 50639-50642, (2004).
- 177 Ott, V. L., Cambier, J. C., Kappler, J., Marrack, P. & Swanson, B. J. Mast cell-dependent migration of effector CD8⁺ T cells through production of leukotriene B4. *Nat Immunol* **4**, 974-981, (2003).
- 178 Tager, A. M. *et al.* Leukotriene B4 receptor BLT1 mediates early effector T cell recruitment. *Nat Immunol* **4**, 982-990, (2003).
- 179 Ternowitz, T., Herlin, T. & Fogh, K. Human monocyte and polymorphonuclear leukocyte chemotactic and chemokinetic responses to leukotriene B4 and FMLP. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C* **95**, 47-54, (1987).
- 180 Rola-Pleszczynski, M. & Stankova, J. Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* **80**, 1004-1011, (1992).
- 181 Ford-Hutchinson, A. W., Bray, M. A., Doig, M. V., Shipley, M. E. & Smith, M. J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. *Nature* **286**, 264-265, (1980).
- 182 Luster, A. D. & Tager, A. M. T-cell trafficking in asthma: lipid mediators grease the way. *Nat Rev Immunol* **4**, 711-724, (2004).
- 183 Yamaoka, K. A. & Kolb, J. P. Leukotriene B4 induces interleukin 5 generation from human T lymphocytes. *Eur J Immunol* **23**, 2392-2398, (1993).

- 184 Holgate, S. T., Peters-Golden, M., Panettieri, R. A. & Henderson, W. R., Jr. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol* **111**, S18-34; discussion S34-16, (2003).
- 185 Serhan, C. N. Lipoxins and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin biosynthesis: an update and role in anti-inflammation and pro-resolution. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**, 433-455, (2002).
- 186 Gronert, K., Martinsson-Niskanen, T., Ravasi, S., Chiang, N. & Serhan, C. N. Selectivity of recombinant human leukotriene D(4), leukotriene B(4), and lipoxin A(4) receptors with aspirin-triggered 15-epi-LXA(4) and regulation of vascular and inflammatory responses. *Am J Pathol* **158**, 3-9, (2001).
- 187 Maddox, J. F. & Serhan, C. N. Lipoxin A4 and B4 are potent stimuli for human monocyte migration and adhesion: selective inactivation by dehydrogenation and reduction. *J Exp Med* **183**, 137-146, (1996).
- 188 Watanabe, T., Medina, J. F., Haeggstrom, J. Z., Radmark, O. & Samuelsson, B. Molecular cloning of a 12-lipoxygenase cDNA from rat brain. *Eur J Biochem* **212**, 605-612, (1993).
- 189 Murakami, M. & Kudo, I. Prostaglandin E synthase: a novel drug target for inflammation and cancer. *Curr Pharm Des* **12**, 943-954, (2006).
- 190 Farooqui, A. A., Horrocks, L. A. & Farooqui, T. Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J Neurochem* **101**, 577-599, (2007).
- 191 Phillis, J. W., Horrocks, L. A. & Farooqui, A. A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev* **52**, 201-243, (2006).
- 192 Zaleska, M. M. & Wilson, D. F. Lipid hydroperoxides inhibit reacylation of phospholipids in neuronal membranes. *J Neurochem* **52**, 255-260, (1989).
- 193 Anthonymuthu, T. S., Kenny, E. M. & Bayir, H. Therapies targeting lipid peroxidation in traumatic brain injury. *Brain Res* **1640**, 57-76, (2016).
- 194 Evans, P. H. Free radicals in brain metabolism and pathology. *Br Med Bull* **49**, 577-587, (1993).
- 195 Ames, B. N., Shigenaga, M. K. & Hagen, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7915-7922, (1993).
- 196 Halliwell, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* **59**, 1609-1623, (1992).
- 197 Hall, E. D., Vaishnav, R. A. & Mustafa, A. G. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* **7**, 51-61, (2010).
- 198 Dorman, R. V., Hamm, T. F., Damron, D. S. & Freeman, E. J. Modulation of glutamate release from hippocampal mossy fiber nerve endings by arachidonic acid and eicosanoids. *Adv Exp Med Biol* **318**, 121-136, (1992).
- 199 Normandin, M. *et al.* Involvement of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism in homosynaptic long-term depression of the rat hippocampus. *Brain Res* **730**, 40-46, (1996).

- 200 Tobaben, S. *The role of 12/15-lipoxygenases in ROS-mediated neuronal cell death*. Dissertation Fachbereich Pharmazie Philipps-Universität Marburg, (2011).
- 201 Maher, P. & Davis, J. B. The role of monoamine metabolism in oxidative glutamate toxicity. *J Neurosci* **16**, 6394-6401, (1996).
- 202 Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M. & Altman, D. G. Improving bioscience research reporting: The ARRIVE guidelines for reporting animal research. *J Pharmacol Pharmacother* **1**, 94-99, (2010).
- 203 Succol, F. & Pratico, D. A role for 12/15 lipoxygenase in the amyloid beta precursor protein metabolism. *J Neurochem* **103**, 380-387, (2007).
- 204 Di Meco, A. *et al.* 12/15-Lipoxygenase Inhibition Reverses Cognitive Impairment, Brain Amyloidosis, and Tau Pathology by Stimulating Autophagy in Aged Triple Transgenic Mice. *Biol Psychiatry*, (2016).
- 205 Koeberle, A. *et al.* Pirinixic acid derivatives as novel dual inhibitors of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J Med Chem* **51**, 8068-8076, (2008).
- 206 Chang, H. H. & Meuillet, E. J. Identification and development of mPGES-1 inhibitors: where we are at? *Future Med Chem* **3**, 1909-1934, (2011).
- 207 Koeberle, A. *et al.* The molecular pharmacology and in vivo activity of 2-(4-chloro-6-(2,3-dimethylphenylamino)pyrimidin-2-ylthio)octanoic acid (YS121), a dual inhibitor of microsomal prostaglandin E2 synthase-1 and 5-lipoxygenase. *J Pharmacol Exp Ther* **332**, 840-848, (2010).
- 208 Terpolilli, N. A. *et al.* The novel nitric oxide synthase inhibitor 4-amino-tetrahydro-L-biopterine prevents brain edema formation and intracranial hypertension following traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* **26**, 1963-1975, (2009).
- 209 Namjoshi, D. R. *et al.* Towards clinical management of traumatic brain injury: a review of models and mechanisms from a biomechanical perspective. *Disease models & mechanisms* **6**, 1325-1338, (2013).
- 210 Dixon, C. E., Lighthall, J. W. & Anderson, T. E. Physiologic, histopathologic, and cineradiographic characterization of a new fluid-percussion model of experimental brain injury in the rat. *J Neurotrauma* **5**, 91-104, (1988).
- 211 Dixon, C. E. *et al.* A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of neurosurgery* **67**, 110-119, (1987).
- 212 Lindgren, S. & Rinder, L. Experimental studies in head injury. I. Some factors influencing results of model experiments. *Biophysik* **2**, 320-329, (1965).
- 213 Lyeth, B. G. Historical Review of the Fluid-Percussion TBI Model. *Front Neurol* **7**, 217, (2016).
- 214 Van, K. C. & Lyeth, B. G. Lateral (Parasagittal) Fluid Percussion Model of Traumatic Brain Injury. *Methods Mol Biol* **1462**, 231-251, (2016).
- 215 Rowe, R. K., Griffiths, D. R. & Lifshitz, J. Midline (Central) Fluid Percussion Model of Traumatic Brain Injury. *Methods Mol Biol* **1462**, 211-230, (2016).

- 216 Thompson, H. J. *et al.* Lateral fluid percussion brain injury: a 15-year review and evaluation. *J Neurotrauma* **22**, 42-75, (2005).
- 217 Lighthall, J. W. Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J Neurotrauma* **5**, 1-15, (1988).
- 218 Dixon, C. E., Clifton, G. L., Lighthall, J. W., Yaghmai, A. A. & Hayes, R. L. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods* **39**, 253-262, (1991).
- 219 Smith, D. H. *et al.* A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma* **12**, 169-178, (1995).
- 220 O'Connor, W. T., Smyth, A. & Gilchrist, M. D. Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation. *Pharmacology & therapeutics* **130**, 106-113, (2011).
- 221 Nilsson, P., Hillered, L., Ponten, U. & Ungerstedt, U. Changes in cortical extracellular levels of energy-related metabolites and amino acids following concussive brain injury in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**, 631-637, (1990).
- 222 Foda, M. A. & Marmarou, A. A new model of diffuse brain injury in rats. Part II: Morphological characterization. *Journal of neurosurgery* **80**, 301-313, (1994).
- 223 Marmarou, A. *et al.* A new model of diffuse brain injury in rats. Part I: Pathophysiology and biomechanics. *Journal of neurosurgery* **80**, 291-300, (1994).
- 224 Feeney, D. M., Boyeson, M. G., Linn, R. T., Murray, H. M. & Dail, W. G. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* **211**, 67-77, (1981).
- 225 Morales, D. M. *et al.* Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap? *Neuroscience* **136**, 971-989, (2005).
- 226 Ezaki, J., Shimada, R., Shibuya, M. & Kibayashi, K. Hippocampal neuronal degeneration in the traumatic brain injury mouse: non-trivial effect of scalp incision. *Neurol Res* **38**, 994-1002, (2016).
- 227 Bolouri, H. & Zetterberg, H. in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects Frontiers in Neuroengineering* (ed F. H. Kobeissy) (2015).
- 228 Osier, N. D., Korpon, J. R. & Dixon, C. E. in *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects Frontiers in Neuroengineering* (ed F. H. Kobeissy) (2015).
- 229 Gatson, J. W. *et al.* Resveratrol decreases inflammation in the brain of mice with mild traumatic brain injury. *J Trauma Acute Care Surg* **74**, 470-474; discussion 474-475, (2013).
- 230 Bruschetta, G. *et al.* FeTPPS Reduces Secondary Damage and Improves Neurobehavioral Functions after Traumatic Brain Injury. *Front Neurosci* **11**, 6, (2017).
- 231 Khan, M. *et al.* S-nitrosoglutathione reduces oxidative injury and promotes mechanisms of neurorepair following traumatic brain injury in rats. *J Neuroinflammation* **8**, 78, (2011).
- 232 Chen, W. *et al.* Connexin40 correlates with oxidative stress in brains of traumatic brain injury rats. *Restor Neurol Neurosci* **35**, 217-224, (2017).

- 233 Schaible, E. V. *et al.* Single administration of tripeptide alpha-MSH(11-13) attenuates brain damage by reduced inflammation and apoptosis after experimental traumatic brain injury in mice. *PLoS one* **8**, e71056, (2013).
- 234 Dhillon, H. S., Donaldson, D., Dempsey, R. J. & Prasad, M. R. Regional levels of free fatty acids and Evans blue extravasation after experimental brain injury. *J Neurotrauma* **11**, 405-415, (1994).
- 235 Osier, N. D. & Dixon, C. E. The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions. *Front Neurol* **7**, 134, (2016).
- 236 Dixon, C. E. *et al.* One-year study of spatial memory performance, brain morphology, and cholinergic markers after moderate controlled cortical impact in rats. *J Neurotrauma* **16**, 109-122, (1999).
- 237 Zhao, Z., Loane, D. J., Murray, M. G., 2nd, Stoica, B. A. & Faden, A. I. Comparing the predictive value of multiple cognitive, affective, and motor tasks after rodent traumatic brain injury. *J Neurotrauma* **29**, 2475-2489, (2012).
- 238 Cheng, J. P. *et al.* A relatively brief exposure to environmental enrichment after experimental traumatic brain injury confers long-term cognitive benefits. *J Neurotrauma* **29**, 2684-2688, (2012).
- 239 Zweckberger, K., Stoffel, M., Baethmann, A. & Plesnila, N. Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J Neurotrauma* **20**, 1307-1314, (2003).
- 240 Firsching, R., Woischneck, D., Klein, S., Ludwig, K. & Dohring, W. Brain stem lesions after head injury. *Neurol Res* **24**, 145-146, (2002).
- 241 Lesko, M. M. *et al.* Models of mortality probability in severe traumatic brain injury: results of the modelling by the UK trauma registry. *J Neurotrauma* **30**, 2021-2030, (2013).
- 242 Statler, K. D. *et al.* Isoflurane exerts neuroprotective actions at or near the time of severe traumatic brain injury. *Brain Res* **1076**, 216-224, (2006).
- 243 Thal, S. C. *et al.* Volatile anesthetics influence blood-brain barrier integrity by modulation of tight junction protein expression in traumatic brain injury. *PLoS one* **7**, e50752, (2012).
- 244 Zhao, D. A., Bi, L. Y., Huang, Q., Zhang, F. M. & Han, Z. M. Isoflurane provides neuroprotection in neonatal hypoxic ischemic brain injury by suppressing apoptosis. *Braz J Anesthesiol* **66**, 613-621, (2016).
- 245 Hertle, D. *et al.* Influence of isoflurane on neuronal death and outcome in a rat model of traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl* **114**, 383-386, (2012).
- 246 Liu, J., Wang, P., Zhang, X., Zhang, W. & Gu, G. Effects of different concentration and duration time of isoflurane on acute and long-term neurocognitive function of young adult C57BL/6 mouse. *Int J Clin Exp Pathol* **7**, 5828-5836, (2014).
- 247 Li, Z. Q. *et al.* Duration-dependent regulation of autophagy by isoflurane exposure in aged rats. *Neurosci Bull* **31**, 505-513, (2015).
- 248 Magnuson, M. E., Thompson, G. J., Pan, W. J. & Keilholz, S. D. Time-dependent effects of isoflurane and dexmedetomidine on functional connectivity, spectral characteristics, and spatial distribution of spontaneous BOLD fluctuations. *NMR Biomed* **27**, 291-303, (2014).

- 249 Sendobry, S. M. *et al.* Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol* **120**, 1199-1206, (1997).
- 250 Chang, J. *et al.* 12/15 Lipoxygenase regulation of colorectal tumorigenesis is determined by the relative tumor levels of its metabolite 12-HETE and 13-HODE in animal models. *Oncotarget* **6**, 2879-2888, (2015).
- 251 Wu, M. Y. *et al.* Involvement of 15-lipoxygenase in the inflammatory arthritis. *J Cell Biochem* **113**, 2279-2289, (2012).
- 252 Werz, O. *et al.* Novel and potent inhibitors of 5-lipoxygenase product synthesis based on the structure of pirinixic acid. *J Med Chem* **51**, 5449-5453, (2008).
- 253 Camp, P. E., James, H. E. & Werner, R. Acute dimethyl sulfoxide therapy in experimental brain edema: Part I. Effects on intracranial pressure, blood pressure, central venous pressure, and brain water and electrolyte content. *Neurosurgery* **9**, 28-33, (1981).
- 254 Lu, C. & Mattson, M. P. Dimethyl sulfoxide suppresses NMDA- and AMPA-induced ion currents and calcium influx and protects against excitotoxic death in hippocampal neurons. *Experimental neurology* **170**, 180-185, (2001).
- 255 Budinich, C. S., Tucker, L. B., Lowe, D., Rosenberger, J. G. & McCabe, J. T. Short and long-term motor and behavioral effects of diazoxide and dimethyl sulfoxide administration in the mouse after traumatic brain injury. *Pharmacol Biochem Behav* **108**, 66-73, (2013).
- 256 Yigitkanli, K. *et al.* Inhibition of 12/15-lipoxygenase as therapeutic strategy to treat stroke. *Annals of Neurology* **73**, 129-135 (2013).
- 257 Lapchak, P. A., Maher, P., Schubert, D. & Zivin, J. A. Baicalein, an antioxidant 12/15-lipoxygenase inhibitor improves clinical rating scores following multiple infarct embolic strokes. *Neuroscience* **150**, 585-591, (2007).
- 258 Yigitkanli, K., Zheng, Y., Pekcec, A., Lo, E. H. & van Leyen, K. Increased 12/15-Lipoxygenase Leads to Widespread Brain Injury Following Global Cerebral Ischemia. *Transl Stroke Res*, (2016).
- 259 Unterberg, A. W., Stover, J., Kress, B. & Kiening, K. L. Edema and brain trauma. *Neuroscience* **129**, 1021-1029, (2004).
- 260 Kleindienst, A., Dunbar, J. G., Glisson, R. & Marmarou, A. The role of vasopressin V1A receptors in cytotoxic brain edema formation following brain injury. *Acta Neurochir (Wien)* **155**, 151-164, (2013).
- 261 Marmarou, A. Pathophysiology of traumatic brain edema: current concepts. *Acta Neurochir Suppl* **86**, 7-10, (2003).
- 262 Diringer, M. N. *et al.* No reduction in cerebral metabolism as a result of early moderate hyperventilation following severe traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* **92**, 7-13, (2000).
- 263 Diringer, M. N. *et al.* Regional cerebrovascular and metabolic effects of hyperventilation after severe traumatic brain injury. *Journal of neurosurgery* **96**, 103-108, (2002).

- 264 Bouma, G. J. & Muizelaar, J. P. Cerebral blood flow, cerebral blood volume, and cerebrovascular reactivity after severe head injury. *J Neurotrauma* **9 Suppl 1**, S333-348, (1992).
- 265 Schroder, M. L., Muizelaar, J. P., Fatouros, P., Kuta, A. J. & Choi, S. C. Early cerebral blood volume after severe traumatic brain injury in patients with early cerebral ischemia. *Acta Neurochir Suppl* **71**, 127-130, (1998).
- 266 Torrente, D. *et al.* Cortical spreading depression in traumatic brain injuries: is there a role for astrocytes? *Neurosci Lett* **565**, 2-6, (2014).
- 267 Dreier, J. P. *et al.* Recording, analysis, and interpretation of spreading depolarizations in neurointensive care: Review and recommendations of the COSBID research group. *J Cereb Blood Flow Metab*, 271678X16654496, (2016).
- 268 Kraig, R. P. & Nicholson, C. Extracellular ionic variations during spreading depression. *Neuroscience* **3**, 1045-1059, (1978).
- 269 Canals, S. *et al.* Longitudinal depolarization gradients along the somatodendritic axis of CA1 pyramidal cells: a novel feature of spreading depression. *J Neurophysiol* **94**, 943-951, (2005).
- 270 Fabricius, M., Jensen, L. H. & Lauritzen, M. Microdialysis of interstitial amino acids during spreading depression and anoxic depolarization in rat neocortex. *Brain Res* **612**, 61-69, (1993).
- 271 Nedergaard, M. & Hansen, A. J. Spreading depression is not associated with neuronal injury in the normal brain. *Brain Res* **449**, 395-398, (1988).
- 272 Kumarathasan, R. & Leenen, F. H. Effects of soybean lipoxygenase on Na⁺/K⁺-ATPase activity in vitro. *Can J Physiol Pharmacol* **78**, 691-695, (2000).
- 273 Li, D., Belusa, R., Nowicki, S. & Aperia, A. Arachidonic acid metabolic pathways regulating activity of renal Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase are age dependent. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F823-829, (2000).
- 274 Kellet, G. L., Barker, E. D., Beach, N. L. & Dempster, J. A. Effect of nordihydroguaiaretic acid on glucose absorption, metabolism and (Na⁽⁺⁾+K⁽⁺⁾)-ATPase activity in rat jejunum. *Biochem Pharmacol* **45**, 1932-1935, (1993).
- 275 Foley, T. D. 5-HPETE is a potent inhibitor of neuronal Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 374-376, (1997).
- 276 Chattopadhyay, R. *et al.* 12/15-Lipoxygenase-dependent ROS production is required for diet-induced endothelial barrier dysfunction. *J Lipid Res* **56**, 562-577, (2015).
- 277 Ryman, V. E., Packiriswamy, N. & Sordillo, L. M. Apoptosis of Endothelial Cells by 13-HPODE Contributes to Impairment of Endothelial Barrier Integrity. *Mediators Inflamm* **2016**, 9867138, (2016).
- 278 Plesnila, N. The immune system in traumatic brain injury. *Curr Opin Pharmacol* **26**, 110-117, (2016).
- 279 Balu, R. Inflammation and immune system activation after traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* **14**, 484, (2014).

- 280 McKee, C. A. & Lukens, J. R. Emerging Roles for the Immune System in Traumatic Brain Injury. *Front Immunol* **7**, 556, (2016).
- 281 Russo, M. V. & McGavern, D. B. Inflammatory neuroprotection following traumatic brain injury. *Science* **353**, 783-785, (2016).
- 282 Uderhardt, S. & Kronke, G. 12/15-lipoxygenase during the regulation of inflammation, immunity, and self-tolerance. *J Mol Med (Berl)* **90**, 1247-1256, (2012).
- 283 Serhan, C. N., Chiang, N. & Van Dyke, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol* **8**, 349-361, (2008).
- 284 Merched, A. J., Serhan, C. N. & Chan, L. Nutrigenetic disruption of inflammation-resolution homeostasis and atherogenesis. *J Nutrigenet Nutrigenomics* **4**, 12-24, (2011).
- 285 Yang, H., Zhuo, J. M., Chu, J., Chinnici, C. & Pratico, D. Amelioration of the Alzheimer's disease phenotype by absence of 12/15-lipoxygenase. *Biol Psychiatry* **68**, 922-929, (2010).
- 286 Wang, X. *et al.* Resolution of inflammation is altered in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* **11**, 40-50 e41-42, (2015).
- 287 Sun, L. *et al.* 12/15-Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid activate PPARgamma: a possible neuroprotective effect in ischemic brain. *J Lipid Res* **56**, 502-514, (2015).
- 288 Huang, J. T. *et al.* Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* **400**, 378-382, (1999).
- 289 Ackermann, J. A., Hofheinz, K., Zaiss, M. M. & Kronke, G. The double-edged role of 12/15-lipoxygenase during inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* **1862**, 371-381, (2017).
- 290 Han, J., Sun, L., Xu, Y., Liang, H. & Cheng, Y. Activation of PPARgamma by 12/15-lipoxygenase during cerebral ischemia-reperfusion injury. *Int J Mol Med* **35**, 195-201, (2015).
- 291 Murphy, T. H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R. L. & Coyle, J. T. Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron* **2**, 1547-1558, (1989).
- 292 Pallast, S., Arai, K., Wang, X., Lo, E. H. & van Leyen, K. 12/15-Lipoxygenase targets neuronal mitochondria under oxidative stress. *J Neurochem* **111**, 882-889, (2009).
- 293 Higgins, G. C., Beart, P. M. & Nagley, P. Oxidative stress triggers neuronal caspase-independent death: endonuclease G involvement in programmed cell death-type III. *Cell Mol Life Sci* **66**, 2773-2787, (2009).
- 294 Stern, N. *et al.* Potential role of 12 hydroxyeicosatetraenoic acid in angiotensin II-induced calcium signal in rat glomerulosa cells. *Endocrinology* **133**, 843-847, (1993).
- 295 Orrenius, S., Zhivotovsky, B. & Nicotera, P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nature reviews. Molecular cell biology* **4**, 552-565, (2003).
- 296 Li, Y., Maher, P. & Schubert, D. A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* **19**, 453-463, (1997).

- 297 Nazarewicz, R. R. *et al.* 12(S)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid (12-HETE) increases mitochondrial nitric oxide by increasing intramitochondrial calcium. *Arch Biochem Biophys* **468**, 114-120, (2007).
- 298 Pallast, S. *et al.* Increased nuclear apoptosis-inducing factor after transient focal ischemia: a 12/15-lipoxygenase-dependent organelle damage pathway. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1157-1167, (2010).
- 299 Slemmer, J. E. *et al.* Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury. *Am J Pathol* **173**, 1795-1805, (2008).
- 300 Schaar, K. L., Brenneman, M. M. & Savitz, S. I. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* **2**, 13, (2010).
- 301 Cui, L. *et al.* Baicalein is neuroprotective in rat MCAO model: role of 12/15-lipoxygenase, mitogen-activated protein kinase and cytosolic phospholipase A2. *Pharmacol Biochem Behav* **96**, 469-475, (2010).
- 302 Rai, G. *et al.* Potent and selective inhibitors of human reticulocyte 12/15-lipoxygenase as anti-stroke therapies. *J Med Chem* **57**, 4035-4048, (2014).
- 303 Abdel-Tawab, M., Werz, O. & Schubert-Zsilavecz, M. Boswellia serrata: an overall assessment of in vitro, preclinical, pharmacokinetic and clinical data. *Clin Pharmacokinet* **50**, 349-369, (2011).
- 304 Brock, T. G. & Peters-Golden, M. Activation and regulation of cellular eicosanoid biosynthesis. *ScientificWorldJournal* **7**, 1273-1284, (2007).
- 305 Bazan, N. G., Rodriguez de Turco, E. B. & Allan, G. Mediators of injury in neurotrauma: intracellular signal transduction and gene expression. *J Neurotrauma* **12**, 791-814, (1995).
- 306 Choi, S. H., Aid, S. & Bosetti, F. The distinct roles of cyclooxygenase-1 and -2 in neuroinflammation: implications for translational research. *Trends Pharmacol Sci* **30**, 174-181, (2009).
- 307 Hartig, W. *et al.* Impact of 5-lipoxygenase inhibitors on the spatiotemporal distribution of inflammatory cells and neuronal COX-2 expression following experimental traumatic brain injury in rats. *Brain Res* **1498**, 69-84, (2013).
- 308 Lammers, C. H. *et al.* Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. *J Neurochem* **66**, 147-152, (1996).
- 309 Ohtsuki, T. *et al.* Reperfusion induces 5-lipoxygenase translocation and leukotriene C4 production in ischemic brain. *Am J Physiol* **268**, H1249-1257, (1995).
- 310 Uz, T., Manev, R. & Manev, H. 5-Lipoxygenase is required for proliferation of immature cerebellar granule neurons in vitro. *European journal of pharmacology* **418**, 15-22, (2001).
- 311 Wada, K. *et al.* Leukotriene B4 and lipoxin A4 are regulatory signals for neural stem cell proliferation and differentiation. *FASEB J* **20**, 1785-1792, (2006).
- 312 Bijlsma, M. F., Peppelenbosch, M. P., Spek, C. A. & Roelink, H. Leukotriene synthesis is required for hedgehog-dependent neurite projection in neuralized embryoid bodies but not for motor neuron differentiation. *Stem cells* **26**, 1138-1145, (2008).
- 313 Temple, S. The development of neural stem cells. *Nature* **414**, 112-117, (2001).

- 314 Reh, T. A. Neural stem cells: form and function. *Nature neuroscience* **5**, 392-394, (2002).
- 315 Voigt, C. *et al.* Effect of leukotriene inhibitors on evolution of experimental brain contusions. *Neuropathology and applied neurobiology* **38**, 354-366, (2012).
- 316 Harting, M. T., Jimenez, F., Adams, S. D., Mercer, D. W. & Cox, C. S., Jr. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery* **144**, 803-813, (2008).

Ohne die Unterstützung einer Vielzahl von Leuten wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Mein herzlicher Dank gilt daher:

Herrn **Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila** für die Überlassung des Themas, die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung

Frau **Dr. med. Nicole Terpolilli** für die exzellente Betreuung, die hervorragende Einarbeitung in die Methoden und die vielen hilfreichen Tipps.

Frau **Uta Mamrak**, Frau **Nicole Heumos**, Herrn **Sergej Mandari** und Herrn **Ari Dienel** für die Hilfe bei Fragen zur Methodik sowie das angenehme Arbeitsumfeld

Meinen **Mitdoktoranten** für den wissenschaftlichen Austausch und die gute Arbeitsatmosphäre

Den **Mitarbeitern des Walter-Brendel-Zentrums** für das angenehme Arbeitsumfeld

Meiner **Familie**, allen voran meiner Frau Stefanie, für die Geduld während der Stunden des Schreibens und ihre Liebe und Unterstützung

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Christian Brem, erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Effekte der Lipoxygenase-12/15- und der Lipoxygenase-5-Hemmung auf die
Entwicklung des sekundären Hirnschadens nach experimentellem Schädel-Hirn-
Trauma**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle
Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche
kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln
nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht
wurde.

München, 25.06.2018
Ort, Datum

Brem Christian
Unterschrift Doktorand